

Beschreibung
eines neuartigen Verfahrens
zur Untersuchung
von α_2 -Makroglobulin -
Proteinasen - Komplexen

Hans Rainer Slawik

Diss.
München
1986

Aus dem biochemischen Laboratorium (Leitung: Prof. Dr. K.
Hochstrasser) der Hals- Nasen- Ohrenklinik der Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. H. H. Naumann

Beschreibung eines neuartigen Verfahrens zur Untersuchung
von α_2 -Makroglobulin - Proteinasen - Komplexen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans Rainer Slawik

aus
Buchen/Odenwald

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. K. Hochstrasser

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. H. H. Naumann

Prof. Dr. H. Fritz

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.Mai 1986

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

G l i e d e r u n g

	Seite
1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Proteine und ihre Funktionen im Organismus	3
2.2. Proteasen und ihre Funktionen	4
2.2.1. Blutgerinnung und Fibrinolyse	11
2.2.2. Das Komplement-System (C-System)	13
2.2.3. Das Kallikrein-Kinin-System	15
2.2.4. Das Renin-Angiotensin-System	16
2.2.5. Die intrazellulären Proteasen der PMN-Leukozyten	17
2.3. Die Proteinaseinhibitoren des menschlichen Blutplasmas	19
2.3.1. Alpha ₁ -Proteinase Inhibitor	19
2.3.2. Alpha ₁ -Antichymotrypsin	22
2.3.3. Alpha-Cystein-Proteinase Inhibitor	23
2.3.4. C1-Esterase Inhibitor	24
2.3.5. Alpha ₂ -Antiplasmin	26
2.3.6. Beta ₁ -Antikollagenase	28
2.3.7. Antithrombin III (Heparin-Kofaktor)	29
2.3.8. Inter-alpha-Trypsininhibitor und die säurestabile Proteinaseinhibitorfraktion im menschlichen Serum	31
3. Alpha ₂ -Makroglobulin (A2M)	33
3.1. A2M-Formvarianten	33
3.2. Physikochemische Eigenschaften von A2M	34

	Seite
3.3. Zusammensetzung von A2M	35
3.4. Strukturmerkmale von A2M	35
3.5. Bindungseigenschaften von A2M	36
3.5.1. Die Interaktion von Proteinasen mit A2M am Beispiel von Trypsin	41
3.5.2. Die Bindungsverhältnisse von Proteinasen mit A2M und ihr Angriffspunkt in der "Bait-Region"	42
3.6. A2M unter entwicklungsgeschichtlichen Aspekten	44
3.7. Schicksal von A2M-Komplexen im Organismus	45
3.8. Vorkommen und Konzentration von A2M	46
3.9. Veränderungen der A2M-Konzentration bei pathologischen Prozessen	47
3.10. Genetisch bedingte A2M-Mangel-Formen	49
3.11. Chromogene Peptidsubstrate und ihre Anwendungs- möglichkeiten bei der Bestimmung von A2M	50
4. Ergebnisse	52
5. Experimenteller Teil	63
5.1. Material und Methoden	63
5.2. Gewinnung des Untersuchungsmaterials	64
5.3. Reinigung des Antiserums	65
5.4. Präzipitation des Plasmas mit gereinigtem Antiserum	65
5.5. Messung der Enzymaktivitäten im Plasma	66
5.5.1. Kathepsin-G - ähnliche Aktivität	66
5.5.2. Trypsin- u. Plasma-Kallikrein-ähnliche Aktivität	67

	Seite
5.6. Messung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Trypsin- und Plasma-Kallikrein- ähnliche Aktivität	73
5.6.1. Einfluß unterschiedlicher Antikoagulantien	73
5.6.2. Einfluß des Einfrierens auf die Plasmaproben	73
5.6.3. Präzipitationszeit bei verdünntem Plasma	74
5.6.4. Präzipitationszeit bei unverdünntem Plasma	75
6. Diskussion	77
7. Zusammenfassung	80
Literaturverzeichnis	81

1. Einleitung

Proteolytischen Enzymen oder Proteasen kommt bei normalen wie pathologischen Vorgängen im Organismus eine große Bedeutung zu. Proteasen haben nicht nur die Aufgabe, dem Körper zugeführte Nahrungseiweiße zu spalten und die beim natürlichen Zellersatz anfallenden Proteine zu verwerten, sie sind auch unter anderem notwendig zur Regulation von proteolytischen Systemen wie der Blutgerinnung, der Fibrinolyse, entzündlicher oder immunologischer Prozesse.

Damit durch ein eventuelles Überhandnehmen der Proteolyse dem Organismus kein Schaden erwächst, wird diese - neben anderen, später erläuterten, Sicherungsmaßnahmen - durch Proteasen - hemmende Proteine, sogenannte Proteaseninhibitoren blockiert. Neben Inhibitoren, die lokal in den verschiedenen Geweben und Organen wirksam sind, kommt den Inhibitoren des Blutplasmas die größte Bedeutung zu. Die zur Zeit bekannten Plasma - Proteaseninhibitoren machen demzufolge auch etwa 10 Prozent der gesamten Plasmaproteine aus.

Der hohe Inhibitoranteil im Plasma wird verständlich, wenn man die Vielzahl proteolytische Prozesse bedenkt, die im oder über den Blutkreislauf aktiviert werden. Neben Blutgerinnung und Fibrinolyse gehören hierher noch das Kallikrein - Kinin -, das Renin - Angiotensin -, das Komplement - System und die Proteasen der neutrophilen Granulozyten oder polymorphkernigen (PMN-) Leukozyten. (47,56)

Einer dieser Plasma-Proteinaseninhibitoren ist das α_2 -Makroglobulin (A₂M), das unter den Plasmainhibitoren durch seine einzigartigen Eigenschaften und Merkmale schon bald nach seiner erstmaligen Isolierung aus menschlichem Serum im Jahre 1955 große Aufmerksamkeit auf sich gezogen hat.(36)

Die Untersuchung von isoliertem α_2 Makroglobulin zeigte zuverlässig die "in vivo"-Beladung dieses Inhibitors mit Proteinasen auf. Aufgrund dieser Beobachtung und infolge der großen Bedeutung von α_2 Makroglobulin wäre es für Klinik und Forschung sehr interessant, ein für Routinebestimmungen geeignetes, einfaches Verfahren zum Nachweis von α_2 Makroglobulin-Proteinasen-Komplexen zu besitzen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Proteine und ihre Funktionen im Organismus

Proteine sind von essentieller Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Körperfunktionen. Proteine stellen unter anderem die Enzyme, die als Katalysatoren biochemischer Reaktionen fungieren. Proteine dienen ebenso als Strukturbildner der Zelle. Sie sorgen für das Grundgerüst der Gewebe und Organe, z. B. durch das Skleroprotein Kollagen, das in variierender Form in allen Bindegeweben vorkommt. Die Motilität von Zellen wird - etwa bei der Muskelkontraktion - durch Proteine bewerkstelligt. Immunproteine schützen den Organismus vor Fremdeinwirkung, Transportproteine sichern die adäquate Verteilung von im Blutplasma schwer löslichen Molekülen wie Sauerstoff oder Eisen im Kreislaufsystem und damit im Körper. Auch unter den Hormonen als übergeordneten Regulatoren physiologischer Prozesse finden sich in einem sehr erheblichen Prozentsatz Proteine.

Die meisten Eiweiße werden laufend durch Ab- und Neuaufbau umgesetzt. Die "biologische Halbwertszeit", d. h. die Zeitspanne, in der ein Protein zur Hälfte abgebaut und durch neues Material ersetzt ist, beträgt z. B. bei Enzymen wenige Stunden und bei Strukturproteinen, wie etwa Kollagen, einige Monate. Dieser Umsatz oder "Protein - Turnover" wurde durch Zufuhr radioaktiv markierter Aminosäuren in der Nahrung festgestellt. Seine genaue Funktion ist noch immer unbekannt, es existieren lediglich Hypothesen, daß damit unter anderem die Enzymfunktion reguliert werden soll.

Die Menge des abgebauten beträgt ebenso wie die des neusynthetisierten Proteins beim erwachsenen Menschen im Durchschnitt etwa 400 Gramm täglich.

Ein Teil der verstoffwechselten Aminosäuren wird vom Organismus ausgeschieden und deshalb ist regelmäßige Eiweißzufuhr, speziell essentieller Aminosäuren, unerlässlich. (47,56)

2.2. Proteasen und ihre Funktionen

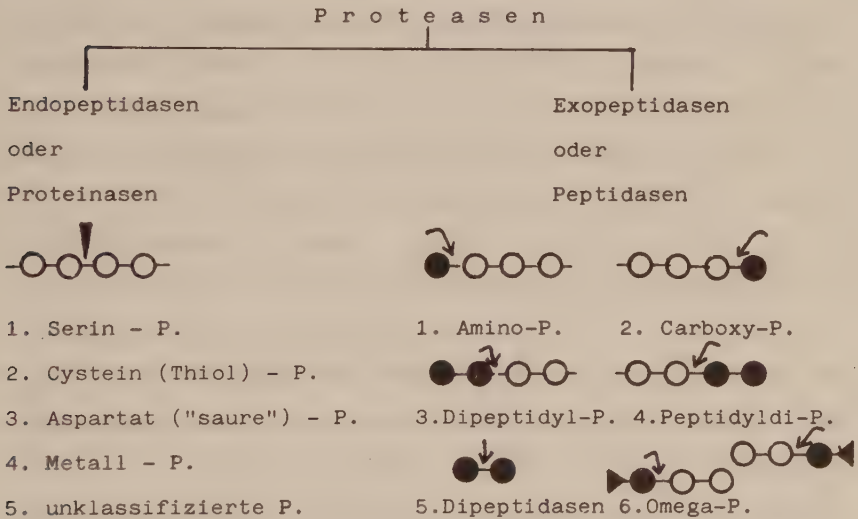
Den ersten Schritt in der Eiweißverwertung stellen die proteolytischen Enzyme oder Proteasen dar. Sie gehören neben den Amylasen zu den am längsten bekannten und am besten untersuchten hydrolytisch aktiven Enzymen. Proteasen katalysieren die hydrolytische Spaltung der Peptid- (C-N) - Bindung. Nach der Nomenklatur der "International Union of Biochemistry" (IUB) zählen sie folglich zur Unterklasse der C-N - Hydrolasen (E.C. - Nummer 3.4.). (47,56)

Proteasen kann man nach ihrem Wirkungsort und ihrer physiologischen Rolle in drei Gruppen unterteilen:

- Verdauungsenzyme des Magen - Darm - Trakts;
- extrazelluläre Proteasen des Blutes oder anderer Extrazellulärflüssigkeiten (z. B. Proteasen der Blutgerinnung);
- intrazelluläre Proteasen, die sich unter anderem in den Lysosomen und in den neutrophilen Granulozyten oder polymorphkernigen (PMN-) Leukozyten finden. Zu dieser Gruppe gehören auch die Enzyme, die die Peptidhormonvorstufen in Peptidhormone umwandeln.

Eine weitere Klassifikation (Abb. 1) orientiert sich am Angriffspunkt der Proteasen an der Peptidkette und unterscheidet so zwischen Endopeptidasen oder Proteinasen, die in der Mitte einer Peptidkette spalten, und Exopeptidasen oder Peptidasen, die eine Peptidkette vom amino - oder carboxyterminalen Ende her sukzessive abbauen. (47)

Diagrammdarstellung der Klassifikation der Proteasen



Serin - Proteinasen besitzen einen Serin- und Histidin-Rest im aktiven Zentrum. Sie reagieren mit ihren Substraten in einer Zweistufenreaktion, aus der nach Ablösung des zweiten Spaltstücks das aktive Enzym wieder frei wird. Die bekanntesten Serin - Proteinasen sind die Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin, die, wie die große Anzahl von 80 gemeinsamen Aminosäureresten zeigt, von dem gleichen Vorläufer - zu dem auch Thrombin und Elastase gehören - abstammen. Aber auch alle Enzyme des Blutgerinnungs- und Komplementsystems sind Serin - Proteinasen. Durch Diisopropylfluorophosphat können die Serin-Proteinasen am aktiven Zentrum spezifisch gehemmt werden.

Cystein - oder Thiol (SH) - Proteinasen tragen einen Cysteinrest im aktiven Zentrum. Zu dieser Gruppe gehört z. B. das intrazelluläre, lysosomale Kathepsin B, das für den "Protein - Turnover" in der Zelle verantwortlich ist.

Andere intrazelluläre Proteinasen haben im Gegensatz zu den bisher aufgeführten Enzymen ihr pH - Optimum im sauren Bereich (pH unter 5,0). Hierher gehören u. a. die Kathepsine D und E, aber auch die Magenenzyme Pepsin A und C. In ihrem aktiven Zentrum ist die Carboxylgruppe eines Asparaginsäurerestes enthalten.

Die Gruppe der Metallproteinase umfaßt Enzyme mit einem Metallion (vielfach Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}). Wichtige Vertreter der Zinkenzyme sind die Kollagenasen, extra- wie intrazelluläre Enzyme, die Kollagenfasern spalten und so den Kollagenstoffwechsel regulieren.

Bei der letzten Gruppe, den unklassifizierten Proteinase, ist der Reaktionsmechanismus noch ungenau erforscht.

Die Spezifität der Proteinasen richtet sich im Unterschied zu den meisten anderen Enzymen nicht nach bestimmten Substraten, sondern nach bestimmten Aminosäureresten der Peptidketten. Demgemäß greifen die Verdauungsenzyme alle Eiweiße an, wobei bereits denaturierte Proteine leichter in Peptidfragmente gespalten werden. Trypsin spaltet an basischen Resten (Arg-, Lys-) und zwar so, daß alle Peptidbruchstücke, mit Ausnahme des ursprünglichen C - terminalen Peptidendes, Lysin oder Arginin als C - terminale Aminosäure aufweisen. Chymotrypsin greift an aromatischen Resten (Tyr-, Trp-, Phe-, Leu-) an, Elastase an kurzkettigen Seitenketten wie Alanin und Valin. Die unterschiedliche, eben angeführte Spezifität der homologen Serinproteinasen erklärt sich trotz ihrer engen Verwandtschaft durch die unterschiedliche Art ihrer Spezifitätstaschen, in die die Seitenketten von zu spaltenden Substraten eingelagert werden müssen.

Die andere große Gruppe der Proteasen bilden, wie aus Abb. 1 ersichtlich, die Peptidasen.

Die zu dieser Gruppe gehörenden Carboxypeptidasen A und B, die am C - terminalen Ende der Peptidkette angreifen, finden sich zwar auch in Milz und Niere, vor allem aber im Verdauungsssekret. Typ A, ein Zinkprotein, wird als inaktive Vorstufe vom Pankreas sezerniert und richtet sich spezifisch besonders gegen die von Chymotrypsin freigelegten, C - terminalen Endgruppen. Typ B hingegen ist mehr auf durch Trypsinwirkung entstandene, basische, C - terminale Aminosäuren ausgerichtet.

Erwähnenswert sind noch die Peptidasen, die vom Kettenende her Dipeptide abspalten. Zu den vom carboxyterminalen Ende Dipeptide abspaltenden Enzymen, den Peptidyldipeptidasen, gehört das "Angiotensin Converting Enzyme (ACE)", auch Kininase II genannt. Diese Protease wandelt sowohl Angiotensin I in das blutdrucksteigernde Angiotensin II um, es spaltet aber auch vom blutdrucksenkenden Nonapeptid Bradykinin ein Dipeptid ab und inaktiviert es so. Damit hat dieses Enzym eine synergistische Wirkung, die jeweils zur Blutdruckerhöhung führt. Dies ist aber nur eine aus einer ganzen Reihe von Möglichkeiten, über die der Organismus verfügt, um Enzymaktivitäten zu regulieren. (7,47,114)

Mechanismen zur Regulation von Enzymaktivitäten (nach 114)

1. Neusynthese
2. Zymogenaktivierung
3. Kompetitive Inhibitoren
4. Thiol - Disulfid - Austauschkomplexe
5. Kovalente Modifizierung (Allosterie)
6. Alpha₂-Makroglobulin.

Zu 1) Die Neusynthese ist ein Regulationsvorgang, der in der Zelle abläuft.

Zu 2) Bei der Zymogenaktivierung werden die Enzyme in Form inaktiver Vorstufen gebildet, intrazellulär gespeichert und bei Bedarf sezerniert. Am Wirkungsort dann werden diese Zymogene oder Proenzyme durch enzymkatalysierte, irreversible Abspaltung eines Peptidfragments in die aktiven Enzyme umgebildet. Das aktive Enzym liegt nun frei und der Substratzugang

ist möglich. Wenn die Überführung der inaktiven Vorstufe in das aktive Enzym durch eine kleine Menge des aktiven Enzyms selbst katalysiert wird, wie z. B. bei Trypsin, dann spricht man von autokatalysierter Aktivierung.

Beispiele für Zymogen - Aktivierung sind:

-- Verdauungsenzyme:

Trypsinogen $\xrightarrow{\text{Enteropeptidase, Trypsin}}$ Trypsin + Hexapeptid

Das Dünndarmenzym Enteropeptidase katalysiert 1000fach schneller als autokatalytisch das aktive Trypsin.

Chymotrypsinogen $\xrightarrow{\text{Trypsin}}$ Chymotrypsin

Pepsinogen A $\xrightarrow{\text{pH 1,5-3, Pepsin}}$ Pepsin A

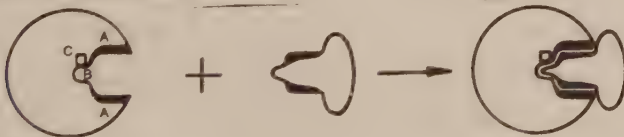
Procarboxypeptidase A u. B $\xrightarrow{\text{Trypsin}}$ Carboxypeptidase A u. B

Proelastase $\longrightarrow$ Elastase

-- Blutgerinnung und Fibrinolyse

-- Komplement-System (C - System).

Zu 3) Kompetitive Inhibitoren lagern sich in die Substratbindungstasche eines Enzyms ein und bilden unter anderem durch Wasserstoffbrückenbindungen stabile Enzym - Inhibitor - Komplexe. Dadurch wird die Substratbindungstasche voll blockiert, das aktive Zentrum verändert und das Enzym auf diese Weise kompetitiv gehemmt (Abb.2).



aktives Enzym

Inhibitor

inaktiviertes Enzym

A: Substratbindungstasche, B: Spezifitätstasche, C: aktives Zentrum

Abb.2 Schematische Darstellung der Assoziation von Enzymen mit kompetitiven Inhibitoren

Die Bindung des Inhibitors an das Enzym ist eine reine Nebenvalenz - Wechselwirkung, bei der keine kovalente Verknüpfung stattfindet. Nach diesem Prinzip wirken sehr viele Proteinasen - Inhibitoren, vor allem pflanzlicher und tierischer Herkunft und teilweise auch die des Blutplasmas.

Zu 4) Die Enzymaktivität von PMN - Kollagenase läßt sich über das Redoxpotential der Zelle regulieren. Die Verbindung erfolgt über eine dem aktiven Zentrum benachbarte S-S.- Brücke.

Zu 5) Allosterie ist ein Regulationsweg, der vor allem beim Komplement - System benützt wird.

Zu 6) Alpha₂-Makroglobulin wird später noch ausführlich besprochen. (114)

Von den aufgeführten Regulationsmechanismen sollen nun die durch Zymogen - Aktivierung regulierten proteolytischen Systeme des Blutplasmas besprochen werden. Abb. 3 zeigt ein vereinfachtes Schema der Verknüpfung dieser einzelnen Systeme miteinander:

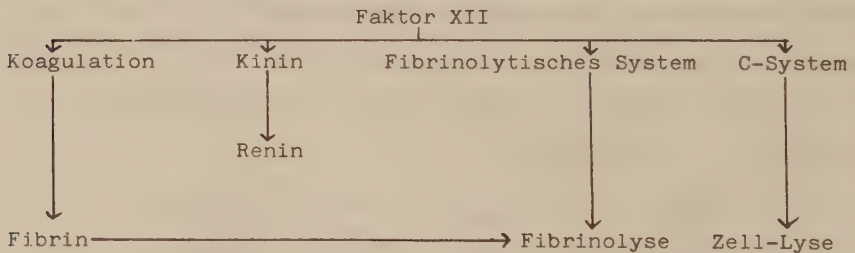


Abb.3 Vereinfachte Darstellung der Verknüpfung einzelner proteolytischer Systeme des Blutplasmas (29)).

2.2.1. Blutgerinnung und Fibrinolyse

Blutgerinnung und Fibrinolyse sind lebensnotwendige Systeme, um einmal den Organismus bei Verletzungen vor dem Verbluten zu schützen, und zum anderen, um nach unnötiger Blutgerinnung oder nach Verletzungen durch Rekanalisierung thrombosierter Gefäße die Blutzufuhr und damit die Heilung geschädigter Gewebe zu gewährleisten. Beide Vorgänge laufen latent ständig nebeneinander im Blutkreislauf ab und stehen normalerweise miteinander im Gleichgewicht. Der Organismus lebt also in einem Zwischenzustand zwischen tödlicher Thrombose und dem Tod durch Verblutung. (56)

Für die Thrombinbildung, die eine zentrale Rolle bei der Blutgerinnung einnimmt, ist die Aktivierung des Stuart - Prower - Faktors (F.X) unabdinglich, der mit Accelerin (F.V), Ca^{2+} und Phospholipiden (PL) einen enzymatisch aktiven Komplex bildet, der - auch Prothrombinase genannt - die Zymogenaktivierung des Prothrombins in Thrombin katalysiert.

Faktor X bildet auf diese Weise die gemeinsame Endstrecke des intra - und extravaskulären Blutgerinnungssystems.

Die Aktivierung des intravaskulären Systems verläuft nach Art eines Wasserfalls, als "Gerinnungskaskade" (Abb.4). Zentrales Enzym dieser Kaskadenaktivierung ist der Hageman - Faktor (F.XII), eine inaktive Serin - Proteinase im Blutplasma. Er wird durch Plasma - Kallikrein (PKK) nach Membran- bzw. allgemein Oberflächenaktivierung (z.B. Kollagen, Elastin oder Kaolin) aktiviert. Dies geschieht durch Abspaltung des N-terminalen Aktivierungspeptids, wodurch eine allosterische Umlagerung erfolgt, die dem aktiven Zentrum den Substratumsatz ermöglicht. Der weitere Aktivierungsvorgang verläuft wie in Abbildung 4 angegeben.

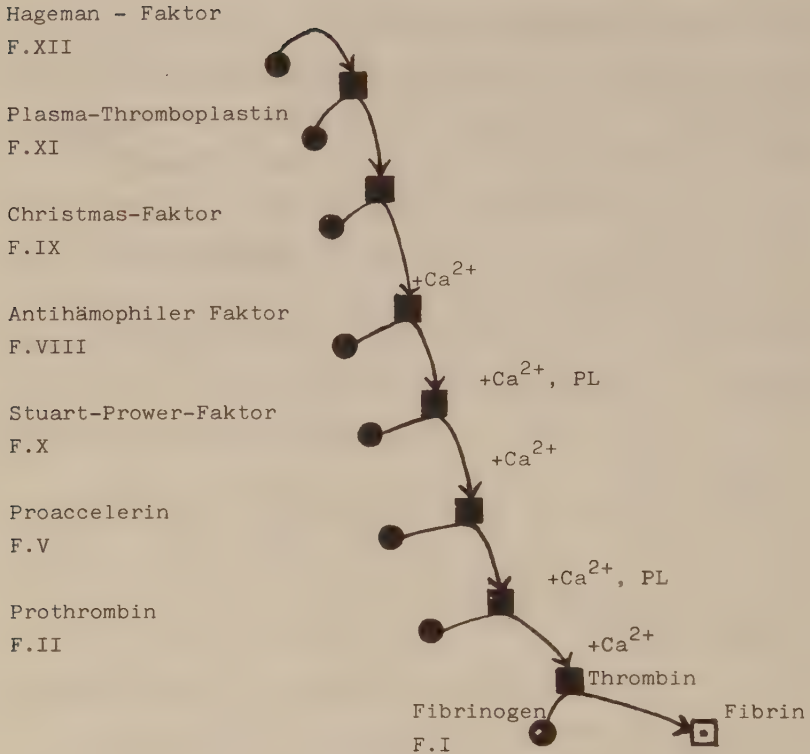


Abb.4 "Gerinnungskaskade" des intravaskulären Blutgerinnungs-systems (114)

Der Sinn dieser, wie jeder anderen enzymatischen Kaskadenreaktion ist die Erzielung eines enormen Verstärkungseffekts - hier etwa um den Faktor 10^6 -, dadurch daß ein aktiviertes Enzym nicht ein Substrat umsetzt, sondern ein anderes Enzym aktiviert.

Am Endpunkt der Gerinnungskaskade erfolgt die durch Thrombin katalysierte Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin. Die hierbei entstehenden Fibrinmonomere bilden Polymerstränge, die durch den aktivierten Faktor XIII vernetzt werden. Das in den Throm-

bozyten enthaltene Thrombosthenin führt zur weiteren Zusammenziehung des Fibrinnetzes. Dieses wird nun ebenfalls durch den aktivierten Faktor XIII mit den Fibroblasten der Wundränder, bzw. ihrem Oberflächenprotein Fibronectin, verknüpft. (47,114)

Die Blutgerinnung ist zwar ein lebenswichtiges Sicherungssystem des Organismus, doch eine über den physiologisch notwendigen Rahmen hinausgehende Aktivierung hätte ebenso fatale Auswirkungen auf den Körper. Eine überschießende Gerinnung wird kompensatorisch durch das fibrinolytische System verhindert.

Dessen Anfangsschritt ist die Aktivierung von Plasminogen durch Plasma - Kallikrein (PKK). Das aktive Plasmin kann aber auch durch andere Proteasen, wie das Nierenenzym Urokinase oder das Bakterienenzym Streptokinase, freigesetzt werden. Es besitzt eine hohe Affinität zu Fibrin und spaltet es in lösliche Peptide, die wiederum Thrombin und die Fibrinpolymerisation hemmen. Das zentrale Enzym der Gerinnungskaskade, der F.XII, ist auch für das fibrinolytische System von großer Bedeutung. Der aktivierte Hageman - Faktor verursacht nämlich auch die Aktivierung von Plasmin durch seinen Einfluß auf den Plasminogen - Aktivator und dessen Vorstufe. (47,114)

2.2.2. Das Komplement - System (C - System)

Auch beim Komplement - oder C - System handelt es sich um einen durch limitierte Proteolyse gesteuerten Kaskadenmechanismus. Auslösend dafür ist die Antigen - Antikörper - Reaktion, die verursacht wird durch z. B. in den Körper eingedrungene Bakterien, an deren Oberfläche Antikörper gebunden sind.

Beim "klassischen" Weg des C - Systems beginnt die Reaktion mit der Anlagerung von Faktor C1q an zwei in passendem Abstand gebundene Antikörpermoleküle; Haftstelle ist eine Domäne im konstanten Abschnitt der H-Ketten. Dadurch wird F.C1r aktiv und greift F.C1s proteolytisch an. Die aktivierte Protease C1s spaltet von den Komplementfaktoren C4 und C2 Aktivierungspeptide ab. Der Komplex C4b-C2a bindet an die Zelloberfläche und reagiert dann mit C3, von dem dann wiederum ein Aktivierungspeptid C3a (ein Anaphylatoxin) abgespalten wird. Das Restmolekül C3 lagert sich an C2a und C4b an und bildet damit ein aktives Enzym, C5-Convertase, welches den Faktor C5 in C5a und C5b spaltet. An C5b lagern sich der Reihe nach die Faktoren C6, C7, C8 sowie sechs Moleküle C9 an; dieser Komplex greift schließlich die Membran an und erzeugt ein Loch.

Am "alternativen" oder Properdin - Weg der Komplementaktivierung sind die Faktoren C3, B, D und P (= Properdin) beteiligt. Der noch nicht genau erforschte Aktivierungsmodus führt schließlich zur Bildung des aktivierten Faktors C3b; der weitere Verlauf entspricht dem "klassischen" Weg. (47)

Die besondere Bedeutung des C - Systems liegt zum einen in seiner Effizienz durch die immense Verstärkung der Kaskadenaktivierung, zum anderen darin, daß alle aktiven Enzyme an der Oberfläche der Antikörper - markierten Zelle und damit an ihrem Wirkungsort liegenbleiben. Auf diese Weise kann die betroffene Zellmembran an vielen Stellen durchlöchert werden. Dies führt dann zur beabsichtigten Lyse der angegriffenen Zelle. (47,114)

2.2.3. Das Kallikrein - Kinin - System

Der bereits bei der Blutgerinnung und Fibrinolyse erwähnte Hageman - Faktor ist auch für das Kallikrein - Kinin - System von großer Bedeutung. Seine wichtige Rolle bei Entzündungsvorgängen im Organismus wird durch Abb. 5 veranschaulicht:

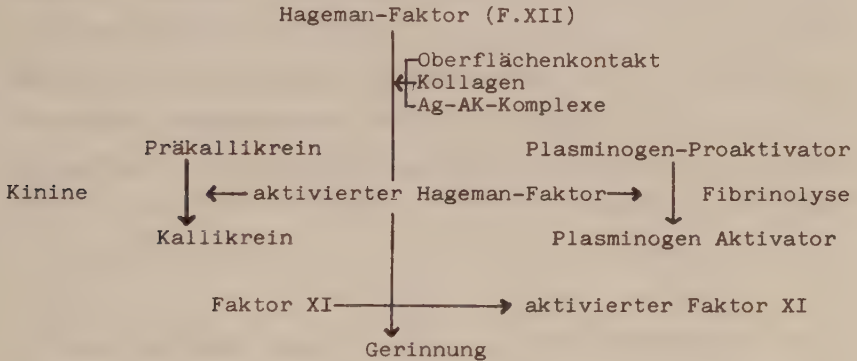


Abb. 5 Rolle des Hageman-Faktors bei der Entzündung (29)

Der Hageman - Faktor aktiviert Plasma - Präkallikrein zum Plasma - Kallikrein (PKK). PKK wiederum setzt u. a. aus dem hochmolekularen Kininogen (HMW - Kininogen), einem Glykoprotein mit einem Molekulargewicht (MW) von etwa 197,000, das Nonapeptid Bradykinin frei. Auch aus dem niedermolekularen Plasmaglykoprotein LMW - Kininogen (MW 57,000) kann Bradykinin freigesetzt werden und zwar in einer Stufenreaktion durch Gewebekallikrein (KK). KK setzt aus dem LMW - Kininogen zuerst Lysbradykinin frei, von dem dann durch eine Amino-peptidase das Lysin abgetrennt und so Bradykinin frei wird. Kinine haben einige wichtige Funktionen, vor allem bei Schädigungen des Körpers:

- 1) Blutdrucksenkung;
- 2) Kontraktion glatter Muskulatur;
- 3) Permeabilitätserhöhung (Entzündungsmediation, Ödembildung);
- 4) Schmerzauslösung.

Neben dem Hageman - Faktor verdient auch das Plasmin als Enzym mit zentraler Stellung nochmals Beachtung. Es wirkt - abgesehen von der aktiven Fibrinolyse - nicht nur auf den aktivierten Hageman - Faktor und auf Präkallikrein - wobei über PKK und den Hageman - Faktor wieder Plasmin freigesetzt wird -, sondern auch durch Aktivierung der C1-Esterase auf das Komplement - System. (114)

2.2.4. Das Renin - Angiotensin - System

Neben dem blutdrucksenkenden Kinin - System gibt es noch ein weiteres proteolytisches und blutdruckwirksames System im

Blutplasma, das Renin - Angiotensin - System, welches aber über eine blutdrucksteigernde Wirkung verfügt.

In der Niere findet die Umwandlung von Prorenin zu Renin statt. Das Enzym Renin setzt aus der hochmolekularen Vorstufe Angiotensinogen Angiotensin I frei, welches durch das schon erwähnte "Angiotensin Converting Enzyme" in das gefäßaktive Angiotensin II umgewandelt wird. ACE kann aber auch als Kininase II Bradykinin inaktivieren. Damit wirkt ACE nicht nur direkt über Angiotensin II blutdrucksteigernd, sondern auch über Inaktivierung des blutdrucksenkenden Bradykinins. (114)

2.2.5. Die intrazellulären Proteasen der PMN - Leukozyten

Die dritte wichtige Abwehrfunktion des Blutes wird neben Lymphozyten und dem Komplement - System von den PMN - Leukozyten ausgeübt.

Sie enthalten intrazellulär eine Vielzahl von enzymhaltigen Granula, in denen unter anderem Elastase, Kathepsin G und Kollagenase gespeichert sind.

Aufgaben dieser Enzyme ist der intrazelluläre Abbau, durch den Leukozyten phagozytierter, Bakterien oder Fremdkörper.

Die nützliche Funktion dieser Enzyme wird für den Organismus pathogen, wenn diese intrazellulären Proteasen in den Extrazellulärraum freigesetzt werden. Dies kann geschehen durch:

- 1) Zelltod;
- 2) Membranperforation von innen, z.B. durch Fremdkörper
- 3) Ausstoß während der Phagozytose;
- 4) umgekehrte Endozytose bzw. frustrierte Phagozytose bei zu großen Fremdkörpern.

Die Enzyme, die dabei freigesetzt werden, sind neben Glykosidasen und Phosphatasen vor allem Proteasen (Tabelle 1):

Proteinasenausstattung neutrophiler Granulozyten

Saure Proteinasen (pH-Optimum 3-5): Kathepsin B1, D und E;

Neutrale Proteinasen (pH-Optimum 7-8):Elastase, Kollagenase,

Kathepsin G, Kininogenase, Plasminogen-Aktivator.

Tabelle 1 Proteinasen der PMN - Leukozyten nach (114).

Abgesehen von diesen speziellen, vor allem dem Proteinabbau dienenden Katalysemechanismen, kennt man daneben heute schon mehrere andere Möglichkeiten der Beeinflussung proteolytischer Systeme durch PMN - Proteasen. Die in Tabelle 2 aufgeführten Systeme und ebenso die möglichen Leukozyten - Proteasen - Wirkungen lassen bereits jetzt, trotz noch weitgehend geringen Wissens auf diesem Gebiet, die äußerst vielschichtigen und interessanten Wechselwirkungen erkennen. (114)

Beeinflussung der proteolytischen Systeme des Blutes durch Granulozytenproteasen

System	Wirkung
Blutgerinnung	A. prokoagulatorisch in der Anfangsphase (einschließlich Faktor-X-Aktivierung) B. Abbau von Faktor VII, VIII, XII, XIII
Fibrinolyse	A. Plasminogenaktivator-Aktivität B. Direkte Fibrinogeno- und Fibrinolyse
Komplementsystem	C5 { C 5 b C 5 a } C 3 { C 3 a C 3 b } Anaphylatoxin 1. Histaminausschüttung 2. Chemotaxis Opsonierung von Zellmembranen Properdin pathway
Kallikrein-Kinin-System	A. Eigenes Leukokininsystem B. Kininfreisetzung C. Kininaktivierung

Tabelle 2: Beeinflussung der proteolytischen Systeme des Blutes durch Granulozytenproteinasen. (114)

2.3. Die Proteinaseinhibitoren des menschlichen Blutplasmas

In Anbetracht der Vielzahl durch limitierte Proteolyse geregelter Prozesse, die im Blutplasma ständig ablaufen, ist der hohe Anteil der Proteinaseinhibitoren (etwa 10 %) am menschlichen Plasma-Gesamteiweißgehalt erklärlich. Die in Tabelle 3 aufgeführten Inhibitoren sollen nachfolgend noch einzeln kurz charakterisiert werden.

2.3.1. Alpha₁-Proteinase Inhibitor

Alpha₁-Proteinase Inhibitor (A1-PI) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 54000 und besteht aus einer Einzelpolypeptidkette mit vier Kohlehydratseitenketten. A1-PI ist für circa 90 Prozent der Trypsinhemmaktivität im Plasma verantwortlich. Dieser Inhibitor wurde deshalb früher Alpha₁-Antitrypsin (A1-AT) genannt. In der Serumelektrophorese läuft er in der alpha₁-Globulinfraction (68).

A1-AP hemmt außer den in Tabelle 3 aufgeführten Enzymen auch noch Gewebs-Kallikreine (Pankreas-, Urin-K.) (40), Pankreas-Elastase, Granulozyten-Elastase (28) und die saure Protease der Alveolarmakrophagen. Er tritt in einer Vielzahl von Körperflüssigkeiten auf:

Tränendrüsensekret, Perilymphe, Lymphe, Speichel, Kolostrum, Muttermilch, Duodenalsaft, Gallenblasengalle, Synovialflüssigkeit, Cervixschleim, Samen- und Amnionflüssigkeit (68).

A1-PI findet sich auch in menschlichem Pankreassaft (66), wobei die Konzentration des Inhibitors bei chronisch kalzifizierender Pankreatitis signifikant erhöht ist. Der Inhibitor tritt im Pankreassekret in freier Form und in einem Komplex mit Chymotrypsin A auf (67).

Merkmale der Plasma - Proteinaseninhibitoren

Inhibitor	Molekulargewicht	Plasma- spiegel	Elektrophor. Beweglichkeit	Zusammen- setzung	Hemmspezifität
Alpha ₁ -Proteinasen-Inhibitor (A ₁ -PI)	54000	2-4 g/l	alpha ₁	einzelne Polypeptidkette (e. PPK)	Trypsin, Chymotrypsin, Plasma-Kallikrein, Thrombin, Urokinase, Akrosin, Plasmin, Renin, Leukozytenproteasen, Bakterienproteasen (XIIa, XIIa, Xa, IXa, Thrombin), Plasmin, Plasma-Kallikrein, Cls, Trypsin, Akrosin, Thrombinähnliche Schlangengiftenzyme Plasmin
Antithrombin III (AT III)	65000	230+35 mg/l	alpha ₂	e. PPK	
Alpha ₂ -Antiplasmin (A ₂ -AP)	70000	ca. 850 mg/l	alpha ₂	e. PPK	
Cl-Inhibitor (Cl-INH)	104000	ca. 250 mg/l	alpha ₂	e. PPK	Cl ₂ , Cl ₁ , Faktor XIIa, PTA, (Faktor XIa)-Pl.-Kallikrein, Plasmin
Alpha ₁ -Antichymotrypsin (A ₁ -Achy)	69000	300-600 mg/l	alpha ₁	e. PPK	Chymotrypsin, Chymotrypsin-ähnliche Enzyme, Leukozyten-Kathepsin G
Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor (ITI)	185000	200-700 mg/l	inter-alpha	e. PPK	Trypsin, Chymotrypsin (Plasmin), Akrosin
Inhibitor der Plasminogenaktivierung (PA-Inhibitor)	70000-75000		alpha ₂		XIIa
beta ₁ -Antikollagenase	30000		beta ₁	e. PPK	Vertebraten-Kollagenase

Tabelle 3: Menschliche Plasma - Proteinaseninhibitoren (nach 114).

Im Serum hat A1-PI eine Halbwertszeit von ungefähr 1 Woche, der Hauptabbauort ist die Leber. A1-PI ist nicht nur deswegen bemerkenswert, weil er der Inhibitor mit der höchsten Konzentration im Blutplasma ist und zu den Akutphasenproteinen gehört, es handelt sich zudem noch um ein sehr polymorphes Protein, von dem sich mittels Elektrofokussierung mehr als 20 Phänotypen abgrenzen lassen.

Die einzelnen A1-PI-Phänotypen unterscheiden sich unter anderem durch ihre Wanderungsgeschwindigkeit in der Elektrophorese. Die Phänotypen wurden auf Grund dieser Eigenschaft mit Buchstaben versehen, und zwar die elektrophoretisch schnelleren mit Buchstaben vom Anfang, die langsameren vom Ende des Alphabets. Mit der Geschwindigkeit ist die Konzentration im Serum gekoppelt, die langsameren Formen haben niedrigere Werte als die schnelleren. So weisen P_1ZZ -Phänotypen minimale Plasmaspiegel auf, P_1MM - bzw. P_1MZ -Phänotypen intermediäre, d.h. normale Konzentrationen.

Im Normalfall (P_1MM -Variante) kann der A1-PI-Spiegel, da der Inhibitor zu den Akutphasenproteinen zählt, nach Traumatisierung des Organismus innerhalb kurzer Zeit stark ansteigen. Bei P_1ZZ - oder P_1SS -Individuen hingegen unterbleibt in einem solchen Fall der Konzentrationsanstieg. Dieses von der Norm abweichende Verhalten hat für die betroffenen Personen fatale Auswirkungen, da aktivierte Proteasen nicht ausreichend gehemmt werden können. So kann eine hereditäre A1-PI-Defekteinämie mit chronisch-obstruktivem Lungenemphysem, neonataler Hepatitis oder einer juvenilen bzw. adulten Leberzirrhose vergesellschaftet sein. Auch zum hepatozellulären Karzinom scheint eine enge Korrelation zu bestehen. (68)

Nach TSCHESCHE und JEPPSSON (115) weist der Inhibitor in einem bestimmten Molekularfragment statt eines Glutaminsäurerestes wie beim normalen M-Protein die Aminosäure Valin im S-Protein und Lysin im Z-Protein auf.

A1-PI kann durch menschliche Granulozyten-Myeloperoxidase in Gegenwart von H_2O_2 und Halogenionen katalytisch inaktiviert werden (62). Dadurch wird die proteolytische Aktivität von phagozytierenden neutrophilen Granulozyten verstärkt, denn diese setzen während der Phagozytose Myeloperoxidase frei. Die Aminosäure Methionin, ein Bestandteil des aktiven Zentrums von A1-PI, wird durch Myeloperoxidase oxydiert (46,68).

2.3.2. Alpha₁-Antichymotrypsin

Das Glykoprotein Alpha₁-Antichymotrypsin (A1-Achy) ist ein Plasmaproteinaseninhibitor, der spezifisch gegen die Serin-Proteinasen der Chymotrypsin-Gruppe gerichtet ist. Zu dieser Gruppe gehören die Enzyme phagozytierender Zellen (neutrophile und basophile Leukozyten, Gewebsmastzellen) (75,113).

A1-Achy besteht aus einer Polypeptideinzelkette. Sein Molekulargewicht beträgt ungefähr 68000, der Kohlehydratanteil annähernd 26 Prozent (110).

Der Inhibitor trägt am aminoterminalen Ende einen Arginin- und am carboxyterminalen Ende einen Glycin-Rest. Das ungewöhnliche aminoterminal Arginin teilt A1-Achy mit einem anderen Plasmaproteinasen-Inhibitor, dem Inter-alpha-Trypsininhibitor.

Neben seiner hohen Spezifität für Chymotrypsin-ähnliche Enzyme zeichnet sich A1-Achy auch noch dadurch besonders aus, daß es zur Gruppe der Akutphasenproteine gehört. Charakteristisch für diese Proteine ist, daß sich ihre Plasmakonzentration inner-

halb kurzer Zeit nach einer Traumatisierung stark erhöht, im Falle des A1-Achy sich binnen 8 Stunden sogar verdoppeln kann (110).

Die Komplexe, die A1-Achy mit Proteinasen wie z.B. Kathepsin G bildet, haben Molekulargewichte um 90000. Dies läßt darauf schließen, daß Enzym und Inhibitor in einem Molverhältnis von 1:1 miteinander reagieren (111,113).

Erhöhte Spiegel von A1-Achy wurden beobachtet bei chronischer Polyarthrititis, Karzinomen, akuten Infekten, Traumata und postoperativ (Akutphasenprotein!) (9).

Nach TRAVIS und MORII ist der Name Alpha₁-Antichymotrypsin für diesen Inhibitor irreführend, da er nicht die physiologischen Verhältnisse dieses Inhibitors berücksichtigt. "In vivo" besteht die Hauptfunktion von A1-Achy in der Kontrolle der Granulozytenproteinase Kathepsin G (75), wohingegen es sehr zweifelhaft ist, daß Chymotrypsin im Organismus überhaupt an den Inhibitor gebunden wird (113).

2.3.3. Alpha-Cystein-Proteinase Inhibitor

Alpha-Cystein-Proteinase Inhibitor (A-CPI) ist ein erst kürzlich entdeckter Plasmaproteinaseinhibitor mit einem Molekulargewicht von etwa 100000. Er hemmt spezifisch unter anderem die menschliche Cystein-Proteinase Kathepsin B und ist noch vor alpha₂-Makroglobulin Hauptinhibitor für dieses Enzym. Der Serumspiegel von A-CPI beträgt beim Menschen $0,33 \pm 0,03$ U/l.

Die genaue physiologische Rolle von A-CPI ist noch unbekannt, doch könnte seine Bedeutung in der Kontrolle von Cystein-Proteinasen bei Entzündungen oder beim Myofibrillenabbau bestehen. (64)

2.3.4. C1-Esterase Inhibitor

C1-Esterase Inhibitor (C1-INH) ist ein Einzelkettenglykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 100000 und Asparagin als aminoterminaler Aminosäure. C1-INH wandert in der Elektrophorese in der α_2 -Bande (73).

Die Plasmakonzentration von C1-INH liegt bei 2,7 mmol/l bzw. 283 g/l (88), $1,63 \pm 0,27$ mmol/l (126) und 200 g/l (92).

Wie α_2 -Antiplasmin enthält C1-INH 3 Disulfidbrücken, wobei die Spaltung zweier Brücken die Inhibitoraktivität nicht, die der dritten aber vollständig aufhebt. Dies deutet daraufhin, daß diese dritte, die "stabile" Brücke von großer Bedeutung für die Konformationsstabilisierung des aktiven Zentrums des Inhibitors ist (73).

Unter physiologischen Bedingungen ist C1-INH der einzige Plasmainhibitor, der mit den Komplementfaktoren C1r und C1s reagiert und so die Aktivität dieser Serin-Proteinasen reguliert. Außerdem ist C1-INH, der auch noch Faktor XIIa-Fragmente, Faktor XIa und Plasmin hemmt, neben α_2 -Makroglobulin (92) der wichtigste Inhibitor für Plasma-Kallikrein (88).

Die Reaktion zwischen den Proteinasen C1r und C1s und dem Inhibitor C1-INH läuft nach den Untersuchungen von NILSSON und WIMAN (72) in zwei verschiedenen Schritten ab. Einer schnellen, reversiblen, initialen Komplexbildung zwischen Enzym und Inhibitor folgt eine langsame, aber irreversible Umbildung in den endgültigen stabilen Enzym-Inhibitor-Komplex. Die Anfangsreaktion zwischen C1s und C1-INH kann durch Heparin um das 16fache beschleunigt werden, die Halbwertszeit von freiem C1s im Plasma liegt bei 1 Sekunde. Heparin verstärkt auch die Wirkung von C1-INH auf C1r und Plasmin, aber in wesentlich geringerem Umfang (92).

Der aus der Reaktion von C1-INH und C1s hervorgehende Komplex hat nach WEISS und ENGEL (122) ein Molekulargewicht von etwa 180000. Da bei der Reaktion eine kleine Menge des Inhibitors in ein großes (Molekulargewicht 95000) und ein kleines (Molekulargewicht 2000-5000) Fragment gespalten wird, läßt sich daraus schließen, daß C1-INH durch C1s, ähnlich wie A1-PI, Antithrombin III und α_2 -Antiplasmin durch ihre spezifischen Enzyme, verändert wird. Dabei wurde wiederum nach Zufuhr von Heparin eine Zunahme der Menge an modifiziertem C1-INH beobachtet.

Die Interaktion von C1-INH mit dem Ca^{++} -abhängigen $\text{C1r}_2\text{-C1s}_2$ -Komplex führt nach CHESNE et al. (16) zur Bildung eines inaktiven $\text{C1r-C1s - C1-INH - Komplexes (1:1:2)}$. Dies deutet auf eine Spaltung von C1r_2 und C1s_2 bei der Bindung an den Inhibitor. Die Bindung zwischen Proteinase und Inhibitor vollzieht sich vermutlich als Esterbindung zwischen einem Serinrest im aktiven Zentrum von C1r oder C1s und C1-INH (16).

Die inhibitorische Aktivität von C1-INH gegen Plasma-Kallikrein und Faktor XIIa - Fragmente kann nach MILES et al. (63) durch synthetische Fibrinolytika, wie z.B. Flufenaminsäure-Derivate, aufgehoben werden. Dieser Effekt wird vom selben Autor auch für α_2 -Antiplasmin beschrieben (63).

Die große physiologische Bedeutung von C1-INH zeigt sich besonders bei einer genetisch determinierten Erkrankung, dem hereditären angioneurotischen Ödem. Hierbei findet sich entweder ein Defizit oder eine funktionell inaktive Form des Inhibitors. Die Erkrankung erstreckt sich auch auf die Kehlkopfschleimhaut und kann durch ein Larynxödem in einem nicht geringen Prozentsatz sogar zum Tode führen (23,88).

2.3.5. Alpha₂-Antiplasmin

Der zur alpha₂-Fraktion in der Elektrophorese zählende Inhibitor alpha₂-Antiplasmin (A2-AP) ist ein aus einer Polypeptidkette bestehendes Glykoprotein, das in drei verschiedenen Molekularformen auftritt. Die Form mit dem höchsten Molekulargewicht (67000) ist im Gegensatz zur mittleren (Molekulargewicht 65000) Form zur Plasminogenbindung fähig. Die kleinste Variante mit einem Molekulargewicht von 60000 besitzt keine Inhibitoraktivität mehr (18).

Wie die Untersuchungen von GRAMSE et al. (34) ergaben, wird dieser Inaktivierungsabbau, der von CLEMMENSEN et al. (18) als spontan im Plasma ablaufend beschrieben wurde, durch Granulozyten-Elastase hervorgerufen. In vivo allerdings erfordert die Inaktivierung von A2-AP durch Elastase so unphysiologisch hohe Enzymkonzentrationen, daß diesem Vorgang wohl nur bei örtlichen Gerinnungsstörungen eine gewisse Bedeutung zukommen dürfte (34).

Nach NILSSON et al. (71) weist A2-AP folgende Strukturmerkmale auf: 16 % alpha-Helix, 18 % beta-Faltblattabschnitte und 66 % Zufallskette ("random coil").

Die wichtigste Funktion von A2-AP in vivo ist die Hemmung von Plasmin. Dabei wird Plasmin so schnell gehemmt, daß freies Plasmin nur sehr kurz im Plasma auftreten kann. Aus diesem Grunde wurde A2-AP früher auch "schnell wirkender Plasmin-Inhibitor" genannt. Die Plasmin-Inaktivierung durch A2-AP, eine der schnellsten bekannten Protein-Interaktionen, wird auch durch Tranexamsäure nicht gehemmt (108).

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die Lysin-Bindungsstellen des Plasmins begrenzt. Bei der Bindung von Plasmin an Fibrin sind die Bindungsstellen belegt und Plasmin ist auf

diese Weise vor dem Inhibitor geschützt (15).

Die Reaktion zwischen Plasmin und dem Inhibitor verläuft als Zweistufenreaktion. Zuerst erfolgt eine sehr schnelle, aber reversible Interaktion über die Lysin-Bindungsstellen und das aktive Zentrum von Plasmin (71), dann eine langsamere, aber irreversible Reaktion (125). Der dabei entstehende, sehr stabile, stöchiometrische 1:1 - Komplex ist mit Konformationsänderungen des A2-AP verbunden (71).

Außer Plasmin hemmt A2-AP mit in der Reihenfolge abnehmender Schnelligkeit auch Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Faktor Xa, Urokinase und Gewebsplasminogenaktivator (125).

Die Konzentration von A2-AP im Plasma (1,0 mmol/l) ist nach CEDERHOLM-WILLIAMS (15) um 32 % höher als im Serum. Die Konzentration des Inhibitors ist vermindert bei gesteigerter Fibrinolyse, wie sie unter Streptokinase-Therapie oder bei Leberzirrhose vorkommt, hingegen gesteigert nach Operationen, post partum und nach akuter Thrombose (109). Bei Patienten mit disseminierter intravasaler Gerinnung (D.I.C) ist der Spiegel ebenso vermindert (44) wie beim Endotoxinschock bei Hunden (1). Während des monatlichen Zyklus der Frau fällt der Spiegel leicht, aber signifikant ab (44).

Die Halbwertszeit von A2-AP beträgt beim Menschen 2,6 Tage, die Syntheserate 1,4 mg/kg Körpergew./Tag (125).

Bei den wenigen, bisher bekannten Fällen, von hereditärem

A2-AP - Mangel tritt bei homozygoten Merkmalsträgern extreme Blutungsneigung auf, wobei Nabelblutungen charakteristisch zu sein scheinen. Bei Heterozygoten wird öfter eine leichtere Blutungsneigung angetroffen. Hereditärer A2-AP-Mangel zeigt ein autosomal codominantes Vererbungsmuster (104).

Aber auch bei normalem A2-AP - Gehalt im Plasma kann die Aktivität dieses Inhibitors vermindert werden, sodaß es zu einer gesteigerten Fibrinolyse kommt. Die Untersuchungen von MILES et al. (63) ergaben, daß synthetische Fibrinolytika, in diesem Falle ein Flufenaminsäure-Abkömmling, ab bestimmten Konzentrationen den Inhibitor inaktivieren und so auf einem zweiten Weg die Fibrinolyse steigern.

2.3.6. Beta₁-Antikollagenase

Beta₁-Antikollagenase (B1-AC) wurde erstmals 1976 von WOOLLEY et al. (129) beschrieben. Dieser Inhibitor, der hochspezifisch Säugetier-Kollagenasen hemmt, besitzt ein Molekulargewicht von etwa 33000 (129,130), bzw. 30500 nach neueren Ergebnissen von MACARTNEY und TSCHESCHE (58). Der Inhibitor bindet menschliche Leukozyten-Kollagenase in einem Molverhältnis von 1:1. Die Reaktion des Inhibitors mit den verschiedenen Kollagenasen läuft mittels Thiol-Disulfid-Austauschkomplexen ab (59). Dieses Reaktionsmuster verhilft B1-AC zu einer besonderen Stellung unter den anderen Plasmainhibitoren.

B1-AC reagiert mit kollagenolytischen Enzymen verschiedenen Ursprungs, so mit den Kollagenasen neutrophiler Granulozyten, der Synovial-Randzellen bei chronischer Polyarthritits, der embryonalen Fibroblasten der Haut, der Hautfibroblasten bei Diabetes mellitus und normaler Hautfibroblasten (59). Im Vergleich mit alpha₂-Makroglobulin, dem anderen bedeutenden Kollagenaseninhibitor des Plasmas, werden Kollagenasen zu 90 % an B1-AC und zu etwa 10 % an alpha₂-Makroglobulin gebunden (59). A1-PI hat nach MACARTNEY und TSCHESCHE (58) keine inhibitorische Wirkung auf Kollagenasen.

2.3.7. Antithrombin III (Heparin-Kofaktor)

Der Inhibitor Antithrombin III (AT III) besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 59000. Das Protein trägt am aminoterminalen Ende einen Histidin-Rest, die carboxyterminale Aminosäure ist Lysin (49).

Die mittlere Plasmakonzentration von AT III beim Menschen beträgt ungefähr 300 mg/l, wobei die Konzentration mit zunehmendem Alter absinkt. Es findet sich kein geschlechtsbedingter Unterschied (3).

AT III bildet in einer langsam ablaufenden Reaktion mit Thrombin Komplexe in einem molaren Verhältnis von 1:1. In Anwesenheit von Heparin wird diese Reaktion stark beschleunigt. Aus diesem Grunde wird AT III auch Heparin-Kofaktor genannt (22, 47). Außerdem inhibiert AT III alle Serin-Proteinasen des Blutgerinnungssystems, Plasmin und Plasma-Kallikrein. Die aktivierten Proteinasen werden vom Inhibitor in einem Komplex irreversibel gebunden, damit inaktiviert und vom retikuloendothelialen System (RES) eliminiert (22).

Veränderungen des Inhibitors in seiner Konzentration oder Zusammensetzung führen zu schwerwiegenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen des Organismus. Ein genetisch determinierter Mangel an AT III führt bei den betroffenen Individuen zu spontaner Thrombosierung der Venen mit allen damit verbundenen Komplikationen.

Beim hereditären AT III - Mangel wird ein immunologisch und funktionell abweichendes Protein aufgrund einer genetischen Fehlcodierung produziert. In anderen Fällen wird ein zwar immunologisch normales, funktionell jedoch fehlerhaftes AT-III synthetisiert (AT "Budapest", AT "Toyama") (84). Beim erst

kürzlich von SAKURAGAWA et al. (84) entdeckten AT III "Toyama" liegt ein autosomal dominant vererbter Defekt vor, der eine AT III - Variante hervorbringt, die keine Affinität zu Heparin mehr besitzt. Sonst sind die physiologischen Verhältnisse des AT III "Toyama" ohne Unterschied zum Normaltyp. Nach KOIDE et al. (49) liegt dem Defekt der Austausch einer Aminosäure am Heparin-Bindungsort gegen eine weniger basische oder saurere Aminosäure beim AT III "Toyama" zugrunde. Dieser Austausch verhindert dann offensichtlich die Interaktion mit Heparin. AT III steht nach REEVE (83) in einem Fließgleichgewicht mit Faktor Xa, Thrombin und den anderen Gerinnungsfaktoren. Diese Ausgangslage führt dann dazu, daß erniedrigte AT-Spiegel mit einer gesteigerten Thromboseneigung einhergehen.

Bei Patienten mit Hirnvenenthrombosen z. B. ist der AT III-Spiegel niedriger als bei solchen mit Hirngefäßblutungen (3). Klinisch läßt sich die Inhibitorkonzentration zur Therapieverlaufskontrolle bei der Behandlung tiefer Venenthrombosen mit Heparin verwerten (22).

Zur Isolierung des Inhibitors aus Plasma läßt sich dessen hohe Affinität zu Heparin nutzen, um auf einfache Art und Weise eine hohe Ausbeute an AT III zu erzielen (127).

2.3.8. Inter-alpha-Trypsininhibitor und die säurestabile Proteinaseinhibitorfraktion im menschlichen Serum

Inter-alpha-Trypsininhibitor (ITI) gehört mit einem Molekulargewicht von etwa 180000 zu den hochmolekularen Inhibitoren des menschlichen Serums (41,45). Dennoch spielt ITI unter den übrigen Inhibitoren eine eher untergeordnete Rolle, da sein Anteil an der gesamten antitryptischen Aktivität des Serums lediglich 1 Prozent beträgt (41).

Außer Trypsin umfaßt das Hemmspektrum dieses Inhibitors auch noch Chymotrypsin, Akrosin und Elastase aus menschlichen neutrophilen Granulozyten (PMN-Leukozyten) (45). Damit wäre ITI nach α_2 -Makroglobulin und α_1 -Proteinase Inhibitor der dritte Plasmaproteinaseinhibitor, der menschliche Granulozyten-Elastase zu hemmen vermag. Zur Hemmaktivität muß noch angeführt werden, daß ITI für bovines Trypsin und Chymotrypsin eine höhere Affinität aufweist als für die entsprechenden menschlichen Serin-Proteinasen.

Nach HOCHSTRASSER et al. (41) ist der säurelabile ITI die Vorstufe säurestabiler Proteinaseinhibitoren im menschlichen Serum und Urin. Dabei handelt es sich in erster Linie um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 30000, das in der Prä-Albumin-Fraktion der Serumelektrophorese wandert (41,74). Trypsinbehandlung wiederum setzt aus ITI einen säurestabilen Inhibitor mit einem Molekulargewicht von 14000 frei. Dieser kleinere Inhibitor läßt sich ebenfalls durch Trypsinbehandlung aus höhermolekularen, säurestabilen Inhibitor gewinnen. Da ITI aufgrund seines hohen Molekulargewichtes glome-

zulär nicht filtriert werden kann, dient dieser Abbau wahrscheinlich der Aufgabe, den Inhibitor nierengängig zu machen, um so vielleicht proteolytische Aktivitäten in den ableitenden Harnwegen hemmen zu können (41).

Außer den bereits erwähnten säurestabilen Inhibitoren läßt sich noch ein weiterer säurestabiler Inhibitor im Serum nachweisen. Dieser Inhibitor läuft im α_1 -Bereich der Elektrophorese und reagiert mit Antikörpern gegen α_1 -Proteinase Inhibitor. Offensichtlich handelt es sich dabei um restlichen, freien α_1 -Proteinase Inhibitor (74).

Erhöhungen im Serumspiegel dieser säurestabilen Inhibitoren, die sich außer im Serum und Urin auch im Bronchialsekret finden lassen, treten vor allem bei Nierenerkrankungen bzw. Nierenversagen und Entzündungen auf (41,74).

3. Alpha₂-Makroglobulin

Das hochmolekulare Sialoglykoprotein alpha₂-Makroglobulin (A2M) gehört zu den Hauptplasmaeaproteinen des Menschen. Seit seiner erstmaligen Isolierung aus menschlichem Serum durch SCHULTZE et al. im Jahre 1955 wurde immer deutlicher, daß dieser Inhibitor eine einzigartige Stellung unter den Plasmaeaproteinaseninhibitoren des Menschen, aber auch der anderen Vertebraten, einnimmt. Dies zeigt sich in seinem überaus breiten Hemmspektrum und in seinem einzigartigen Reaktionsmechanismus mit Proteinasen (36).

Nach der Hypothese von BARRETT fungiert A2M nämlich als Käfig ("trap") für aktive Proteinasen. In diesen A2M-Käfig wird die Proteinase eingeschlossen und nach außen so abgeschirmt, daß lediglich niedermolekulare Substrate oder Inhibitoren Zugang zu ihr finden.

A2M stellt möglicherweise einen uralten Schutzmechanismus des Körpers dar, da nur dieser Inhibitor die Proteasen von Parasiten und bestimmten anderen Krankheitserregern hemmen kann (6). Die besonderen Merkmale in der Struktur und Funktion werden nun nachfolgend zusammengefaßt.

3.1. A2M-Formvarianten

A2M tritt in zwei ziemlich voneinander abweichenden Formen auf, die nach ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit unterschieden werden:

1) S ("slow") - A2M, die langsam wandernde Form, die dem im Kreislauf zirkulierenden Protein entspricht und Proteinasen binden kann;

2) F ("fast") - A2M, die schnelle Form, die irreversibel aus der S-Form nach Reaktion derselben mit Proteinasen oder niedermolekularen Aminen entsteht (6,8,101,117,118).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von SCHRAMM & SCHRAMM (89) mit Computer-Mittelung der Ergebnisse zeigten, daß A2M in einer "offenen" und "geschlossenen" Form auftritt. Dabei entspricht die "geschlossene" Form dem F-A2M.

Interessant ist in diesem Zusammenhang noch die Beobachtung von HUBBARD und Mitarb. (43), daß F-A2M auf gemischte Lymphozyten-Kulturen suppressiver wirkt als die freie S-Form.

3.2. Physikochemische Eigenschaften von A2M

A2M ist sowohl Hitze- als auch Säure-empfindlich (36). Das Protein wird denaturiert bei einem pH-Wert unter 4,0 und teilt sich in die nicht kovalent assoziierten Halbmoleküle (6).

Ammoniumsulfat hebt die Trypsinbindungsfähigkeit von A2M auf und ist deshalb für dessen Reinigung unbrauchbar (36).

Schonende Reduktion des nativen Proteins bewirkt eine reversible Dissoziation in inaktive, aber native Vierteluntereinheiten. S-A2M bildet mit Ammonium, Methylamin und Hydroxylamin im basischen Milieu die inaktive F-Form (6).

Das relative Molekulargewicht von A2M beträgt bei der Bestimmung mittels Ultrazentrifugation 725000 (6) und 735000 (13) in der Röntgenstrukturanalyse.

3.3. Zusammensetzung von A2M

A2M ist ein Sialoglykoprotein mit einem Kohlehydratanteil von 8-10 Prozent (6). Seine vier identischen Untereinheiten bestehen aus jeweils etwa 1450 Aminosäuren (95). Die Ergebnisse bei der Feststellung der Aminosäuresequenz wurden von HARPEL (36) zusammengefaßt. Ferner wird auf die Arbeit von SOTTRUP-JENSEN und Mitarb. (95) über die Primärstruktur von A2M verwiesen.

3.4. Strukturmerkmale von A2M

A2M besteht aus 4 identischen Untereinheiten (Molekulargewicht 180000-185000), die über Disulfid-Brücken paarweise miteinander verbunden sind. Die daraus bestehenden Halbmoleküle sind einander nicht kovalent zugeordnet (6,116). Aus der nativen S-A2M - Untereinheit mit einem relativen Molekulargewicht von etwas über 180000 können verschiedene kleinere Fragmente freigesetzt werden. So enthält die Untereinheit eine Bindung, etwa zwei Drittel der Kettenlänge vom Aminoende entfernt, die in denaturiertem S-A2M, speziell bei erhöhter Temperatur oder alkalischem pH, spontan gespalten wird (= autolytisches Zentrum) und zwei Fragmente mit Molekulargewichten von 139000 und 68000 freisetzt. Die anfällige Bindung des autolytischen Zentrums ist einem Glutaminsäure-Rest benachbart, der mit einem nahegelegenen Cystein-Rest einen Thiol-Ester bildet, der im S-A2M aber sterisch abgeschirmt ist.

Die proteolytische Spaltung der Untereinheit führt zu zwei Fragmenten mit Molekulargewichten von 110000 und 98000 (6,37,42).

Bei Umwandlung von S-A2M in die F-Form ändert sich wahrscheinlich die Konformation der Untereinheiten und es resultiert daraus eine Zunahme der Interaktion zwischen den Untereinheiten. Dies führt dann offensichtlich zu einer größeren Veränderung in der Gestalt des Gesamtmoleküls, worauf auch elektronenmikroskopische Untersuchungen hindeuten (89). Einzelheiten dazu werden bei der Besprechung der Bindungseigenschaften von A2M mit Proteinasen aufgeführt (6).

3.5. Die Bindungseigenschaften von A2M

Die besondere Stellung des A2M unter den Inhibitoren zeigt sich darin, daß 3 Möglichkeiten der Bindung anderer Moleküle gegeben sind:

- 1) der spezifische "Käfig" für Proteinasen ("trap"-Hypothese);
- 2) die kovalente Bindung von Proteasen und anderen Molekülen;
- 3) die nicht kovalente, nicht sterische Adhärenzreaktion ohne Bezug zur proteolytischen Aktivität.

Käfig-Hypothese

Die Käfig ("trap") - Hypothese dient der Erklärung der charakteristischen Interaktionsform von A2M mit Proteinasen.

Diese Besonderheiten sind:

- 1) A2M reagiert nur mit aktiven Endopeptidasen aller Klassen, wobei genaue Spezifität und katalytischer Mechanismus des jeweiligen Enzyms unwichtig sind;
- 2) Sättigung von A2M mit einer beliebigen Proteinase verhindert die Reaktion mit irgendeiner anderen Proteinase;
- 3) alle Reaktionen des gebundenen Proteinase-Moleküls werden, bis auf niedermolekulare Substrate oder Inhibitoren mit

einem Molekulargewicht unter 10000 sterisch verhindert;

4) das Proteinase-Molekül ist irreversibel gebunden. (6,97)

Jede A2M-Untereinheit hat ungefähr in der Mitte ihrer Peptidsequenz eine "Bait" (=Köder)-Region, die sehr anfällig für limitierte Proteolyse ist. Dabei handelt es sich um eine Peptidsequenz von 27 Aminosäuren, die von 2 Prolin-Resten begrenzt wird (121).

Der proteolytische Angriff in der "Bait"-Region durch eine aktive Proteinase löst eine Konformationsänderung des A2M-Moleküls aus, die bewirkt, daß die Proteinase wie in einem Käfig oder in einer Falle ("trap") eingeschlossen wird. In dem durch Reaktion der S-Form mit Proteinase entstandenen F-A2M bleibt typischerweise die Reaktionsfähigkeit des aktiven Zentrums des jeweiligen Enzyms gegenüber niedermolekularen Substraten und Inhibitoren erhalten. Dies zeigt deutlich, daß das aktive Zentrum des Enzyms an der Bindung nicht beteiligt ist, wie z. B. bei der Bindung an andere Inhibitoren. Die Molekulargewichtsgrenze, die noch einen ungehinderten Zugang zum eingeschlossenen Enzym erlaubt, liegt bei etwa 10000.

Dieses Modell könnte auch die Varianz bei der experimentellen Ermittlung der Bindungsverhältnisse für Proteinase erklären, denn bei einer definierten Anzahl von Bindungsstellen am Inhibitor wird sich immer ein festes Sättigungsverhältnis für Proteinase ermitteln lassen. (6)

A2M hat ein wesentlich größeres Hemmspektrum als alle anderen Proteinaseinhibitoren, da es mit Proteinase aller 4 Klassen reagiert.

Zu den im Käfig gebundenen Serin-Proteinasen gehören:

Chymotrypsin, Trypsin, Thrombin, Plasmin, Plasma-Kallikrein, Akrosin, Pankreas-Elastase, Leukozyten-Elastase, Kathepsin G, Arvin, Batroxobin, Schistosoma mansonii Chymotrypsin-ähnliche Proteinase, Brinase, Serratia sp. E₁₅ proteinase, Staphylococcus aureus "saure" Proteinase, Staphylococcus aureus V8 Proteinase, Subtilisin A und B.

Nicht im Käfig gebundene Serin-Proteinasen sind:

Gewebs-Kallikrein, Urokinase, Enteropeptidase, Faktor XIIa, Komplement-Faktor C1s.

Im Käfig gebundene Cystein-Proteinasen sind:

Kathepsin B, Kathepsin H, Kathepsin L, Calcium-abhängige Proteinase, Papain, Ficin, Bromelain, Clostripain.

Im Käfig gebundene Aspartat-Proteinasen sind:

Chymosin, Kathepsin D, Periplaneta Proteinase.

Nicht im Käfig gebundene Aspartat-Proteinasen sind:

Renin.

Im Käfig gebundene Metall-Proteinasen:

Vertebraten-Kollagenase, Leukozyten-Kollagenase, Crotalus atrox-Gift Proteinase, Crotalus adamanteus-Gift Proteinase, Trichophyton mentagrophytes Keratinase, Pseudomonas aeruginosa Elastase, Thermolysin, Bacillus subtilis Metallproteinase.

Nicht im Käfig gebundenen Metallproteinase sind:

Clostridium histolyticum Kollagenase.

Über einen unklaren Mechanismus werden die neutralen Proteinase von Proteus vulgaris und Fusiformis nodosus im Käfig eingeschlossen.

Die Tatsache, daß einige Proteinase nicht mit A2M reagieren, wie z. B. Urokinase, liegt wahrscheinlich an zu hoher Spezifi-

tät des Enzyms, wie im Falle von Urokinase, oder an einem zu hohen Molekulargewicht, daß ein Einfangen im Käfig verhindert. Die Proteinasen mit dem höchsten Molekulargewicht, deren Bindung gesichert ist, sind Plasmin und Plasma-Kallikrein, beide mit einem relativen Molekulargewicht von etwa 90000.

Die eingeschlossenen Proteinase werden in ihrer Reaktionsfähigkeit sterisch gehemmt, denn alle größeren Moleküle haben, wie bereits erwähnt, keinen Zugang mehr zum eingeschlossenen Enzym. Diese Einschränkung erstreckt sich auch auf die antigenen Eigenschaften der jeweiligen Proteinase. Diese Blockade der Immunreaktion ist einer der deutlichsten Hinweise für die Käfig-Hypothese, denn da die Antigen-Determinanten auf das ganze Molekül verteilt sind, könnten sie durch eine über das aktive Zentrum ablaufende Interaktion nicht vollständig gehemmt werden. Unerwartet ist jedoch die Affinität des Plasmin-A2M-Komplexes für Lysin-Sepharose, denn dies deutet darauf hin, daß der Lysin-Bindungsort des Plasmins frei liegt, das aktive Zentrum sich hingegen im Käfig befindet. (6,116)

Kovalente Bindungsreaktion

Die kovalente Bindung an A2M ist nicht auf Proteinase beschränkt. Auch andere Proteine können kovalent gebunden werden, aber nur in Gegenwart einer aktiven Proteinase (86).

Anschließend an die Spaltung der "Bait"-Region und das damit verbundene "Zuklappen" des Käfigs erscheint reaktiv eine Variante von A2M, das A2M*. Einmal entstanden, kann A2M* mit Nucleophilen reagieren oder es zerfällt sehr rasch. Seine Halbwertszeit beträgt lediglich 112 Sekunden bei pH 7,5 (86).

Bekanntlich kann die Bindung von Proteinen durch Nucleophile

wie Glycin und Lysin in hohen Konzentrationen verhindert werden. Radioaktiv markiertes Glycin und Lysin nun werden auch von A2M, und zwar 1 Mol/Untereinheit, gebunden und konkurrieren damit möglicherweise mit nucleophilen Gruppen von Proteinasen um die Reaktion am elektrophilen Zentrum von A2M*. Die Bindung vollzieht sich vermutlich hauptsächlich über Lysin-Seitenketten und hat keinen sichtbaren Einfluß auf die Inhibitorfunktion von A2M. (6)

Nach HOWARD et al. (42) enthält das elektrophile oder Methylamin-bindende Zentrum einen Pyroglutamyl-Rest. Dieses reaktive Zentrum entspricht der autolytischen Spaltungsstelle der A2M-Untereinheit. Im S-A2M befindet sich wie auch im Komplement-Faktor C3 (48) ein reaktiver Thiol-Ester (116), dessen Reaktion mit Methylamin oder Aktivierung mit Trypsin zum Auftreten einer neuen Cystein-Seitenkette führt (6,86,93). Die Thiol-Ester-Bindung ist im S-A2M sterisch abgeschirmt von der Reaktion mit Nucleophilen, die größer sind als Methylamin. Im A2M* hingegen liegt diese Bindung zur allgemeinen Reaktion frei (6).

Der Angriff des Peptidbindungsstickstoffes am Thirolester führt zur Spaltung der Peptidbindung und zur Bindung eines Pyroglutamyl-Restes am neuen Aminoende. Diese Hypothesen stehen in Zusammenhang mit der Beobachtung, daß F-A2M, das nach Reaktion mit Methylamin entsteht, zur autolytischen Spaltung nicht mehr imstande ist (6).

Primäre Amine hemmen die kovalente Bindung von Proteinase (101,117,118). Sie haben zwar keinen Einfluß auf die Käfig-Bindung von Proteinase, doch führen sie zur Entstehung anormaler Komplexe, z.B. mit Trypsin (119) oder Thrombin (51). In diesen Komplexen ist, vergleichbar mit Trypsin- α_2 -Ma-

kroglobulin-Komplexen nach Säurebehandlung (59), die Hemmwirkung von A2M vermindert und der Zugang spezifischer Inhibitoren ist möglich (119).

Adhärenzreaktion

Die Adhärenzreaktion ist von den bisher besprochenen Mechanismen nach dem bisherigen Stand der Erkenntnis weitgehend unabhängig.

Eine Vielzahl von Molekülen und Teilchen bleibt an A2M anscheinend wie an einer "klebrigen" Substanz haften. So dient A2M als Trägerprotein für das im Plasma befindliche Zink. A2M bindet kationische und basische Moleküle, ebenso besitzt es eine hohe Affinität für hydrophobe Moleküle. Es ist bis jetzt noch nicht geklärt, ob und welche Unterschiede zwischen der F- und S-Form bei dieser Bindungsreaktion vorhanden sind.

Dieser Adhärenzmechanismus ist möglicherweise weitgehend eine Kombination ionischer und hydrophober Wechselwirkungen. Er ist reversibel im Gegensatz zu den anderen beiden Reaktionstypen, unabhängig von beiden und mit keiner Konformationsänderung verbunden (6).

3.5.1. Die Interaktion von Proteinasen mit A2M am Beispiel von Trypsin

A2M kann 2 Mol Trypsin pro Mol binden (13,89). Nach SOTTRUP-JENSEN (93,94) kommt es bei der Reaktion von Trypsin mit A2M noch vor Spaltung in der "Bait"-Region zur Bildung eines non-kovalenten Komplexes. An diesem Prozeß ist das aktive Zentrum von Trypsin und die "Bait"-Region einer einzelnen Untereinheit von A2M beteiligt. Auf die initiale Komplexbildung folgt, ausgelöst von einem der zwei möglichen, reversibel gebundenen

Trypsinmoleküle, die Aktivierung von A2M durch Spaltung in der "Bait"-Region an einer spezifischen Arg-Leu-Bindung in zwei Untereinheiten. Dies bewirkt eine Konformationsänderung des A2M, die alle Untereinheiten betrifft und die Thiol-Ester in jeder Untereinheit dem Angriff niedermolekularer Nucleophiler zugänglich macht. Durch diesen Prozeß entsteht ein Komplex aus freiwerdendem ("nascent") A2M und Trypsin, der aber sehr rasch zerfällt. In einer Reaktion, die parallel zur Konformationsänderung abläuft, wird das erste Trypsin-Molekül im halben A2M-Molekül "eingefangen" und ist damit an seinem endgültigen Bindungsort, der unabhängig vom aktiven Zentrum und auch von der "Bait"-Region des Inhibitors ist. Danach wird das zweite Trypsin-Molekül ebenfalls durch Spaltung der Arg-Leu-Bindung in der "Bait"-Region der anderen zwei Untereinheiten "eingefangen".

3.5.2. Die Bindungsverhältnisse von Proteinasen mit A2M und ihr Angriffspunkt in der "Bait"-Region

Enzyme, bei denen pro Mol A2M zwei Mol Enzym gebunden werden: Trypsin (13,89), Elastase (30), Chymotrypsin (81).

Enzyme, bei denen pro Mol A2M ein Mol Enzym gebunden wird: Thrombin (106), Plasmin (35,106), Plasma-Kallikrein (88).

Nach VIRCA et al. (121) besteht die Kernstruktur der "Bait"-Region aus 19 Aminosäuren:

X-(1)Arg-Val-Gly-Phe-Tyr-Glu-Gly-Asx-Val-Met-Gly-Arg-Gly-His-Ala-Arg-Leu-Val-His(19)-X.

In dieser inneren Sequenz laufen die primären proteolytischen Spaltungen ab. Umrahmt wird sie von jeweils 4 Aminosäuren, die den amino- und carboxyterminalen Abschluß der "Bait"-Region bilden:

aminoterminale Sequenz: X-Pro-Glu-Gly-Leu-(1)Arg-;

carboxyterminale Sequenz: -His(19)-Val-Glu-Glu-Pro-X.

In diesen Endbereichen der "Bait"-Region sind noch keine Spaltungen bekannt geworden. Die bisher entdeckten Spaltungsorte verschiedener Proteinasen können Tabelle 4 (modifiziert nach 121) entnommen werden.

Angriffspunkte von Proteinasen in der "Bait"-Region

Peptidbindung	Proteinase
(1)Arg-(2)Val	Papain, Trypsin (Rind, Str. griseus)
(2)Val-(3)Gly	Pankreas-Elastase vom Schwein
(3)Gly-(4)Phe	Papain
(4)Phe-(5)Tyr	Kathepsin G, Chymosin (Kalb)
(5)Tyr-(6)Glu	Rinder-Chymotrypsin
(6)Glu-(7)Gly	Staphylokokkus aureus V8 Proteinase
(16)Arg-(17)Leu	Thermolysin, Subtilisin Novo, Human-Plasmin, Rinder-Thrombin und -Trypsin, Trypsin von Str. griseus
(17)Leu-(18)Val	Subtilisin Novo, Str. griseus Proteinase B
(18)Val-(19)His	Elastase von neutrophilen Granulozyten

Tabelle 4: Peptidspaltungsstellen innerhalb der "Bait"-

Region von A2M (modifiziert nach 121)

Aus Tabelle 4 geht hervor, daß zwischen den beiden Gebieten der "Bait"-Region, in denen die 9 bisher bekannten Peptidspaltungen ablaufen, eine Sequenz von 10 Aminosäuren mit einem mittelständigen Methionin-Rest liegt, die bis jetzt keine proteolytischen Spaltungsstellen aufweist. Da bei einem anderen Inhibitor, A1-PI, ein Methionin-Rest die Aktivität des Inhibitors gegenüber Enzymen erhöht, erweckt dieser Methionin-Rest bei A2M besonderes Interesse (46,121).

3.6. A2M unter entwicklungsgeschichtlichen Aspekten

Im Serum einer Vielzahl von Vertebraten findet sich ein dem menschlichen A2M verwandtes, Papain-bindendes Protein. Bei Säugetieren, Vögeln, Reptilien und Amphibien hat es ein dem menschlichen Protein ähnliches Molekulargewicht, nur bei Fischen, einschließlich Lungenatmern, Stachelflossern und anderen, beträgt das Molekulargewicht lediglich 360000 (98,99). Bei den wirbellosen Spezies fand sich lediglich bei der Hufeisenkrabbe (*Limulus polyphemus* L.) ein Endopeptidase-Inhibitor, der an menschliches A2M erinnert, der aber nach STARKEY und BARRETT (98) nicht, nach QUIGLEY & ARMSTRONG sehr wohl mit Methylamin reagiert.

Die Untersuchung des schon erwähnten Papain-bindenden Fisch-Proteins durch STARKEY et al. (99,100) anhand des Proteins von *Pleuronectes platessa* L. zeigte, daß es sich bei diesem, trotz seines geringeren Molekulargewichts von 360000, zweifelsohne um ein Homologes zu menschlichem A2M handelt.

Bei Säugetieren, z.B. bei Ratte und Kaninchen, kommen A2M-Formen vor, die zu den Akutphasenproteinen gehören, mit dem menschlichen A2M jedoch eindeutig strukturell verwandt sind (70). Im Schweineserum läßt sich A2M sogar wie beim Menschen in einer S- und in einer F-Form u. a. durch Kreuzreaktionen identifizieren (123,124).

Aus fetalem Kälberserum läßt sich ein "Embryonin" genannter Wachstumsfaktor von dem Glykoprotein Fetuin isolieren, der in Struktur und Eigenschaften große Ähnlichkeit mit menschlichem A2M aufweist (85).

Unter Berücksichtigung aller Fakten kann man wohl annehmen,

daß menschliches A2M, seine Homologen und wahrscheinlich auch die Komplementfaktoren C3 und C4 (48,100) von einem gemeinsamen urzeitlichen Vorläuferprotein abstammen. Dabei hatte dieses Protein anfangs wohl erst ein Molekulargewicht von 360000, das sich erst im Lauf der Evolution zur heutigen Größe entwickelt hat (98).

Das hohe Alter von A2M läßt sich auch aus der Tatsache belegen, daß dieser Inhibitor als einziger Proteinasen von Mikroorganismen und Parasiten hemmen kann (116).

3.7. Schicksal von A2M-Komplexen im Organismus

Nach OHLSSON et al. (77) werden Trypsin-A2M-Komplexe durch Rezeptor-vermittelte Endocytose von Makrophagen aufgenommen. Dieser Prozeß ist abhängig von der in den Makrophagen enthaltenen gamma-Glutamyl-Transferase. Es wird angenommen, daß ein ähnlicher Mechanismus auch bei der Endocytose durch Fibroblasten eine Rolle spielt.

Untersuchungen von OHLSSON & LAURELL (76) mit radioaktiv markierten Proteinasen ergaben, daß A2M-Komplexe sehr schnell aus dem Kreislauf eliminiert werden. Die Halbwertszeit für Trypsin-A2M-Komplexe beträgt dabei 9 und die von Elastase-A2M-Komplexen 12 Minuten. Der Abbau ereignet sich vor allem in den Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) und hier hauptsächlich in den Kupfferschen Sternzellen der Leber.

Dieser rasche Abbau deutet auf eine Schlüsselstellung von A2M als Schutzmechanismus gegen endogene Proteinasen hin. So tritt z.B. bei Hunden nach Trypsin-Sättigung von A2M ein Trypsin-induzierter Schock auf (4). Beim Menschen führt eine 70 %ige Trypsin-Sättigung zu einem hohen Kininogen-Verbrauch (53).

3.8. Vorkommen und Konzentration von A2M

Von WITT & TRITSCHLER (128) wurden Serum- und Plasmakonzentrationen von A2M über die amidolytische Aktivität des A2M-Trypsin-Komplexes ermittelt. Dabei ergaben sich für Jugendliche und Erwachsene folgende Referenzwerte:

<u>Alter</u>	<u>Konzentration (kU/l bzw. g/l)</u>
19-25 Jahre	4,1-12,2 - 1,4-4,1 (Serum)
	4,0-11,2 - 1,4-3,8 (Plasma)
25-61 Jahre	4,1-8,1 - 1,4-2,8 (Serum)
	3,7-7,4 - 1,2-2,5 (Plasma)

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors für Citrat-Plasma ergeben sich also höhere Plasma- als Serumwerte, wobei die ersteren den tatsächlichen Verhältnissen am ehesten entsprechen dürften. Der einzige Faktor, der auf die A2M-Konzentration Einfluß hat, ist nach dieser Untersuchung das Alter. Weder das Geschlecht noch exogene Faktoren wie z. B. Rauchen, Nahrungsaufnahme oder hormonelle Kontrazeption spielen also für die A2M-Konzentration eine Rolle.

Von BURNETT & STOCKLEY (14) wird die Serumkonzentration von A2M bei einem Altersdurchschnitt der untersuchten Personen von $57,1 \pm 10,4$ Jahre mit 2214 ± 775 mg/l angegeben.

Nach CULLMANN & DICK (21) beträgt die Serumkonzentration von A2M bei Männern durchschnittlich $10,2 \pm 3,3$ kU/l und bei Frauen $10,9 \pm 3,2$ kU/l. Die Liquor-Konzentration wird mit $11,9 \pm 5,0$ U/l angegeben.

Im Fruchtwasser kommt A2M in einer Konzentration von durchschnittlich 1,67 g/l vor, wobei die Werte bei Schwangerschaften mit Neuralrohrdefekten erheblich ansteigen (96).

A2M tritt, wohl aufgrund seines hohen Molekulargewichts, nur in minimaler Konzentration im Speichel und überhaupt nicht im reinen Parotissekret auf (79).

Im Sputum findet sich A2M nach BURNETT % STOCKLEY nur bei 60 % der gesunden Kontrollpersonen, hingegen bei 94 % der Individuen mit chronischer Bronchitis und interkurrenten Infekten. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß A2M bei akuten Atemwegsinfekten in höherer Konzentration im Bronchialsekret vorkommt. Die Nachweisgrenze für A2M im Sputum liegt bei etwa 0,2 mg/l (14).

In ähnlich geringer Konzentration findet sich A2M auch in der Synovialflüssigkeit (12), wobei die Konzentration bei degenerativen oder entzündlichen Gelenksaffektionen deutlich erhöht sein kann.

3.9. Veränderungen der A2M-Konzentrationen bei pathologischen Prozessen

Erhöhte A2M-Spiegel im Serum wurden berichtet bei:

schweren Verbrennungen (65), Arthrosen (12), chronische Polyarthrititis (12) und nephrotischem Syndrom (2).

Erniedrigte Spiegel von A2M im Serum wurden berichtet bei:

tiefer Venenthrombose (24), Lungenembolie (24), Leberzirrhose (24), chronischer Bronchitis mit akutem Atemwegsinfekt (14).

Keine Veränderungen zeigte der A2M-Spiegel bei akuter koronarer Ischämie (57), Entzündungen (90) und Lungenemphysem (14). A2M zeigt, wie AT III und A1-PI auch, bei Operationen mit der Herz-Lungen-Maschine einen charakteristischen Verlauf, bei dem ein rascher Anstieg der Serumkonzentration einem vorausgehenden, ebenso raschen, Abfall folgt (80).

Außer in den bereits erwähnten Körperflüssigkeiten läßt sich A2M noch in Aszitesflüssigkeit bei Peritonitis (78) und im Pleurasekret bei chronischer Pankreatitis (11) nachweisen.

Anzumerken ist bei der zuletzt erwähnten Krankheit, daß dabei A2M nicht nur mit Trypsin, sondern auch mit dem pankreatischen sekretorischen Trypsininhibitor vom Kazal-Typ (PSTI) (52) Komplexe bildet (61), wobei der im A2M-Trypsin-PSTI-Komplex gebundene PSTI auch durch Aprotinin-Zufuhr im Überschuß nicht aus dem Komplex freigesetzt werden kann. Dies könnte eine Rolle bei der oft unzureichenden Therapie mit Aprotinin bei Pankreatitis spielen.

A2M findet sich ferner in menschlichem Eiter, z.B. bei Abszessen, in einer Konzentration von 0,32 mg/ml zusammen mit Granulozyten-Kollagenase und -Elastase in freier und Komplex-gebundener Form (25).

Beim nephrotischen Syndrom ist nicht nur, wie schon erwähnt, die Serumkonzentration von A2M erhöht, sondern bei diesem Krankheitsbild übernimmt A2M auch von AT III die Funktion als wichtigster Thrombin-Inhibitor (55).

Eine andere, die Konzentration im Serum nicht betreffende Veränderung tritt bei hereditärem α_1 -Antitrypsinmangel auf. Bei dieser Krankheit ist die Aktivität von im Komplex mit A2M gebundener Elastase wesentlich gesteigert (31).

3.10. Genetisch bedingte A2M-Mangel-Formen

Ein völliges Fehlen von A2M ist offensichtlich mit dem Leben nicht vereinbar (102, 116).

Bei den wenigen, bisher beobachteten Fällen von A2M-Mangel (10,102) handelt es sich vermutlich um einen autosomal-dominanten Erbgang. Bei den betroffenen Individuen sind keine weiteren Veränderungen zu erkennen. Sie scheinen äußerlich völlig gesund zu sein.

Lediglich in einem Fall wird von einem Patienten berichtet, bei dem ein hereditärer A2M-Mangel mit einem Ehlers-Danlos-Syndrom vergesellschaftet ist (60).

Möglicherweise handelt es sich bei den äußerlich gesunden Merkmalsträgern um eine Störung in der Komplexbildung von A2M, die einen Mangel an Enzym-A2M-Komplexen zur Folge hat (102). Die Theorie von BERGQVIST & NILSSON zu dieser Problematik lautet dahingehend, daß es bei gesteigerter Fibrinolyse, z.B. Streptokinase-Therapie, oder bei akuter hämorrhagischer Pankreatitis zu einer Erschöpfung der antiplasmatischen Aktivität des Plasmas kommen kann. Dies hätte eine extreme Blutungsneigung zur Folge (10).

Von SHAPIRA et al. (91) wird der Zusammenhang zwischen cystischer Fibrose und einem Molekulardefekt im A2M berichtet. Dieser, offensichtlich vererbte Defekt hat vermutlich eine verminderte Bindungsfähigkeit für Proteinasen zur Folge.

3.11. Chromogene Peptidsubstrate und ihre Anwendungsmöglichkeiten bei der Bestimmung von A2M

In der Vergangenheit dienten ausschließlich biologische oder synthetische (z.B. Aminosäureester) Substrate zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität des Plasmas. Es war jedoch sehr schwierig, biologische Substrate in der notwendigen Qualität zu gewinnen und bei den synthetischen Substraten ergab sich das Problem, daß Aminosäurederivate nicht selektiv und Amide nicht sensitiv genug waren.

Die Sensitivität und die Selektivität eines Substrats kann aber verbessert werden, indem man eine kurze Peptidkette verwendet, die das natürliche Substrat vor allem an seiner Spaltungsstelle nachahmt. (29)

Diese neuentwickelten synthetischen chromogenen Peptidsubstrate mit para-Nitroanilin (pNA) als Indikatorfarbstoff erlauben folglich die direkte Bestimmung der Aktivität von Proteasen, die "in vivo" aktiviert wurden. Dies ermöglicht gerade bei pathologischen Störungen der Blutgerinnung und Fibrinolyse die direkte Messung der gewünschten Aktivitätsparameter (27).

Das Prinzip der Enzymaktivitätsbestimmung mit chromogenen Substraten beruht auf der amidolytischen Abspaltung des para-Nitroanilins von einem Tri- oder Tetrapeptid in Wasser durch eine aktivierte Proteinase. Die Freisetzungsrates des gelbgefärbten pNA kann im Photometer bei 405 nm anhand der Absorptionzunahme gemessen werden (17, 29).

Einschränkend muß noch angeführt werden, daß trotz verbesserter Eigenschaften gegenüber früheren Substraten das Fehlen absoluter Spezifität eine zweifelsfreie Identifizierung der aktivierten Proteasen nicht zuläßt (27).

Die Anwendung dieser neuen Peptidsubstrate erstreckt sich vor allem auf die Aktivitätsbestimmung von Proteinasen der Blutgerinnung und Fibrinolyse (5,26,27,54) und des Kallikrein-Kinin-Systems (26,32,33,103).

Auch zur Bestimmung von A2M und seinen Komplexen eignen sich chromogene Substrate hervorragend. Dies liegt hauptsächlich daran, daß bekanntlich niedermolekulare Substrate ungehinderter Zugang zu der im A2M-Komplex "gefangenen" Proteinase haben und von dieser auch gespalten werden können.

Die Enzyme, die hauptsächlich für diese Bestimmungen Verwendung finden, sind Trypsin (21,107,128), Plasma-Kallikrein (32,33,50,88) und Plasmin (35,54).

Da A2M offensichtlich für die Regulation der Blutgerinnung (2) und noch mehr der Fibrinolyse (69) von großer Bedeutung ist, ermöglichen die chromogenen Peptidsubstrate nicht nur genaue Aktivitätsbestimmungen, sie erleichtern auch in großem Umfang die technische Laborarbeit bei diesen für die Medizin überaus wichtigen Bestimmungen.

4. Ergebnisse

Es wurde Blutplasma von 14 an malignen Tumoren erkrankten und 15 stationär behandelten Patienten mit nicht bösartigen Erkrankungen untersucht und mit dem von 18 Kontrollpersonen verglichen.

Bei den Tumorpatienten handelte es sich um Tumoren im Kopf-Hals-Bereich mit unterschiedlicher Ausdehnung (TNM-Klassifikation) ohne vorausgegangene Zytostatika- oder Strahlentherapie. Bei drei dieser Patienten wurden das Plasma im Verlauf der Therapie kontrolliert. Bei den stationär behandelten Patienten wurde, um einen Vergleich zu den ansonsten nüchtern abgenommenen Plasmaproben zu erhalten, Plasma postprandial gewonnen. Bei den Patienten, bei denen ausreichend hohe Enzymaktivitäten im Plasma photometrisch gemessen werden konnten, wurde die Aktivität im Probenüberstand nach Präzipitation der α_2 -Makroglobulin-Komplexe in Prozent der im nativen Plasma gemessenen Enzymaktivität angegeben.

In Vorversuchen von HOCHSTRASSER (unveröffentl. Ergebnisse) mit Substrat für Kathepsin-G - ähnliche Proteasen zeigte sich, daß die Untersuchung der Enzymaktivität im Serum wesentlich höhere Werte ergab als im Plasma. Dies dürfte darin begründet sein, daß im Serum vor allem die Proteinasen der Blutgerinnungskaskade aktiviert werden. Daraus ergibt sich, daß Serum für eine Enzymaktivitätsbestimmung, die den in vivo-Verhältnissen möglichst entsprechen soll, ungeeignet ist. Auch von anderen Untersuchern (128) wird bestätigt, daß nur Untersuchungen von A2M-Komplexen im Plasma verlässlich sind.

Bei der Untersuchung von α_2 -Makroglobulin-Komplexen müssen einige wichtige Faktoren berücksichtigt werden:

1. Aufgrund der kurzen HWZ (ca. 10 min.) von A2M-Komplexen (76) kann man nur einen sehr geringen Anteil von mit Proteinasen beladenem A2M erwarten. Dieser Anteil von A2M-Komplexen dürfte in Exsudatflüssigkeiten infolge der eingeschränkten Verbindung zum Intravasalraum höher sein, doch kommt diesem Umstand keine Bedeutung zu, da A2M wegen seines hohen Molekulargewichts ohnehin nur sehr niedrige Konzentrationen außerhalb der Blutbahn besitzt. Ausnahmen davon finden sich nur bei entzündlichen Prozessen, bei denen die Blut-/Gewebeschranke in ihrer Funktion beeinträchtigt ist und auch größeren Molekülen die Passage ins Gewebe möglich ist (12,14,79).

2. Eine konventionelle, immunologische Anreicherung von A2M ist zwar möglich, der dazu aber notwendige Arbeitsaufwand läßt diese Methoden für Routineuntersuchungen im klinischen Labor nicht in Frage kommen.

3. Da aber hinlänglich bekannt ist, daß neben dem freien A2M auch mit Proteasen beladene Komplexe mit Antikörpern fällbar sind, wobei die im "Käfig" gebundenen Enzyme von niedermolekularen Substraten noch erreicht werden können, ist die Präzipitation mit Antikörpern unter dem Gesichtspunkt der leichten und schnellen Durchführbarkeit als Methode der Wahl anzusehen.

Zur Ausfällung von A2M-Komplexen wurde spezifisches Immunglobulin G vom Kaninchen (Behring-Werke) gegen Human- α_2 -Makroglobulin verwendet. Plasma wurde mit diesem IgG bei

37°C im Wasserbad inkubiert, wobei sich nach beendeter Inkubation in jeder Probe ein deutlicher Niederschlag zeigte, bei dem es sich zweifelsfrei um A2M-Komplexe handelte. Dies wurde durch immunoelektrophoretische Untersuchungen der Überstände nach Ausfällung und auch der Präzipitate sichergestellt.

In weiteren Vorversuchen wurde anschließend ein optimales Verhältnis von A2M und Anti-A2M-IgG ausgetestet, bei dem eine vollständige Ausfällung des gesamten freien und mit Enzym beladenen A2M sichergestellt ist.

Die Bestimmung der Kathepsin-G-ähnlichen Aktivität im Normalplasma und im Plasma-Überstand nach Präzipitation desselben mit Anti-A2M-IgG zeigte, daß dieses Enzym zumindest bei dem hier untersuchten Kollektiv nicht frei im Plasma oder im A2M-Komplex vorhanden war (Tab.1).

Tab.1: Kathepsin-G-ähnliche Aktivität im Plasma

Normalplasma=N, Tumorplasma=T, E-Werte

Probe	Nativplasma	A2M-Überstand
N1	0.099	0.142
N2	0.150	0.110
T1	0.114	0.113
T2	0.094	0.106
T3	0.089	0.101
T4	0.092	0.096
T5	0.064	0.098
T6	0.082	0.094

Bei der Aktivitätsmessung mit dem chromogenen Peptidsubstrat S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA), das zur Messung Trypsin-ähnlicher, proteolytischer Aktivität besonders gut geeignet ist, zeigte sich bei 11 von 18 Kontrollpersonen deutliche proteolytische Aktivität im Nativplasma und im Überstand nach Fällung der A2M-Komplexe (Tab.2).

Tab.2: Trypsin-ähnliche Aktivität im Plasma

E-Werte, Kontrollproben, S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA)

Probe	Nativplasma	A2M-Überstand	Enzymaktivität in %	
			frei	A2M-gebunden
1	1.245	0.393	31,4	68,6
2	0.045	0.026		
3	0.068	0.045		
4	0.696	0.110	15,8	84,2
5	0.119	0.070		
6	0.042	0.026		
7	0.034	0.032		
8	0.225	0.070	31,1	68,9
9	0.030	0.061		
10	0.151	0.123		
11	1.208	0.348	28,8	71,2
12	1.272	0.398	31,3	68,7
13	0.465	0.079	17,0	83,0
14	0.782	0.047	6,0	94,0
15	0.483	0.055	11,4	88,6
16	0.057	0.021		
17	0.776	0.076	9,8	90,2
18	0.020	0.120		

Die mit A2M-spezifischen Antikörpern ausfällbare Aktivität betrug zwischen 68 und 94 %, d.h. daß von der im Nativplasma meßbaren Enzymaktivität nur 6 bis 32 % in freier, d.h. nicht an A2M gebundener Form vorlagen.

Die Untersuchung von Plasmaproben von Tumorpatienten mit dem Substrat S-2288 erbrachte nur bei 5 von 19 Proben eine erhöhte freie und an A2M gebundene Aktivität (Tab. 3).

Tab. 3: Trypsin-ähnliche Aktivität im Plasma bei Tumoren

E-Werte, Substrat S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA)

Probe	Nativplasma	A2M-Überstand	Enzymaktivität in %	
			frei	A2M-gebunden
T 1	0.596	0.040	6,7	93,3
T 2	0.121	0.035	28,9	71,1
T 3	0.064	0.033		
T 4	0.056	0.035		
T 5	0.569	0.076	13,4	86,6
T 6	0.169	0.060	35,5	64,5
T 7	0.155	0.024	15,5	84,5
T 8	0.054	0.017		
T 9/1	0.036	0.041		
T 9/2	0.011	0.026		
T 9/3	0.018	0.028		
T10/1	0.027	0.037		
T10/2	0.018	0.030		
T10/3	0.014	0.026		
T11/1	0.015	0.027		
T11/2	0.010	0.026		

Tab. 3: Fortsetzung

Probe	Nativplasma	A2M-Überstand	Enzymaktivität in %	
			frei	A2M-gebunden
T12	0.011	0.066		
T13	0.004	0.020		
T14	0.021	0.032		

Die dabei festgestellten proteolytischen Aktivitäten waren jedoch wesentlich niedriger (höchster E-Wert T1 =0,596) als bei der Kontrollgruppe (höchster E-Wert N12 =1.272).

Die Testung mit dem chromogenen Substrat S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA) ergab bei 10 von 16 Nüchternproben, aber nur bei 4 von 15 postprandial entnommenen Proben auswertbare Enzymaktivitäten. Knapp 60 und etwas über 90 % der feststellbaren Enzymaktivität war bei den Nüchternproben an A2M gebunden, bei den Postprandialproben zwischen 45 und 65 % (Tabelle 4).

Tab. 4: Plasma-Kallikrein - ähnliche Proteinaseaktivität

E-Werte, Kontroll-(nüchtern)/Postprandialplasma (P)

Probe	Nativplasma	A2M-Überstand	Enzymaktivität in %	
			frei	A2M-gebunden
1	0.529	0.120	22,7	77,3
2	0.035	0.055		
3	0.195	0.082	42,0	58,0
6	0.062	0.064		
7	0.060	0.075		
8	0.407	0.074	18,2	81,8
9	0.039	0.066		
10	0.294	0.075	25,5	74,5

Tab. 4: Fortsetzung

Probe	Nativplasma	A2M-Überstand	Enzymaktivität in *	
			frei	A2M-gebunden
11	0.946	0.323	34,1	65,9
12	0.523	0.159	30,4	69,6
13	0.387	0.060	15,5	84,5
14	0.497	0.053	10,7	89,3
15	0.629	0.047	7,5	92,5
16	0.084	0.098		
17	0.578	0.041	7,1	92,9
18	0.062	0.069		
19 P	0.056	0.100		
20 P	0.313	0.122	39,0	61,0
21 P	0.084	0.194		
22 P	0.111	0.138		
23 P	0.372	0.127	34,1	65,9
24 P	0.222	0.118	53,1	46,9
25 P	0.088	0.103		
26 P	0.084	0.163		
27 P	0.141	0.133		
28 P	0.199	0.158		
29 P	0.162	0.213		
30 P	0.081	0.135		
31 P	0.073	0.255		
32 P	0.172	0.160		
33 P	0.119	0.270		

Tab. 5: Plasma-Kallikrein-ähnliche Aktivität in Tumorplasma

E-Werte, Substrat S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA)

Probe	Nativplasma	A2M-Überstand	Enzymaktivität in %	
			frei	A2M-gebunden
T 1	0.494	0.060	12,1	87,9
T 2	0.173	0.062	35,8	64,2
T 3	0.065	0.017	26,1	73,9
T 4	0.100	0.075		
T 5	0,401	0.078	19,4	80,6
T 6	0.220	0.040	18,2	81,8
T 7	0.195	0.039	20,0	80,0
T 8	0.083	0.019	22,9	77,1
T 9/1	0.066	0.049		
T 9/2	0.020	0.036		
T 9/3	0.020	0.050		
T10/1	0.045	0.073		
T10/2	0.018	0.027		
T10/3	0.025	0.040		
T11/1	0.018	0.030		
T11/2	0.012	0.025		
T12	0.023	0.034		
T13	0.018	0.040		
T14	0.042	0.033		

Bei den Tumorplasmaproben zeigten 7 von 19 Proben Enzymaktivitäten an. Wie die A2M-Präzipitationsversuche ergaben, lag die an A2M gebundene Aktivität zwischen 65 und 90 % (Tab.5).

Wie beim Substrat S-2288 ergaben sich auch beim Substrat S-2302 für das Kontrollplasma höhere Werte für E als für Tumorphlasma. Das postprandial abgenommene Plasma nahm eine Mittelstellung ein.

Vor allem beim Tumor- und beim Postprandialplasma gab es Proben, bei denen wider Erwarten die A2M-Präzipitationsübersstände deutlich höhere E-Werte ergaben als die Nativproben und zwar für beide Substrate (S-2288, S-2302).

Beim Vergleich der Antikoagulantien Heparin und Trinatriumcitratdihydrat zeigte sich anhand des chromogenen Substrats S-2302, daß die Verwendung von Heparin mit einer höheren, meßbaren Enzymaktivität im Plasma einhergeht, daß beim Citratplasma aber der meßbare Aktivitätsunterschied durch Einfrieren und Wiederauftauen der Plasmaproben wesentlich geringer ist (siehe Tabelle 6).

Tab.6: Einfluß von Antikoagulantien und Lagerung auf die Plasma-Kallikrein - ähnliche Aktivität im Plasma

Normalplasma, 3-fach Ansatz, E-Werte, H=Heparin, C=Citrat

Probe	E-Wert Frischplasma	E-Wert Tiefkühlplasma
H1	0.166	0.136
H2	0.130	0.132
H3	0.152	0.129
C1	0.091	0.101
C2	0.103	0.106
C3	0.104	0.101

Die Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der Präzipitationszeit von A2M-Komplexen im Plasma ergaben, daß maximal 4 Stunden bei Verwendung verdünnten Plasmas für die vollständige Ausfällung von A2M-Komplexen ausreichend sind (Tabelle 7).

Die gleiche Untersuchung mit unverdünntem Frischplasma erbrachte als Resultat wesentlich höhere E-Werte bei maximal 2 Stunden als ausreichender Präzipitationszeit (Tab. 8).

Tab.7: Einfluß der Inkubationszeit auf die Präzipitation von A2M-Komplexen

E-Werte, t=Inkubationszeit in Stunden, A2M-Präzipitat=Niederschlag nach Ausfällung von A2M mit spezifischem IgG

Zeit	Nativplasma	A2M-Überstand	A2M-Präzipitat
t=1	0.076	0.154	0.053
t=2	0.124	0.179	0.051
t=3	0.096	0.083	0.048
t=4/1	0.067	0.058	0.036
t=4/2	0.195	0.103	0.047
t=6	0.077	0.073	0.020
t=8	0.083	0.078	0.042
t=16	0.064	0.078	0.032
t=24	0.060	0.072	0.035

Tab.8: Untersuchung der Trypsin- und Plasma-Kallikrein-ähnlichen Aktivitäten in unverdünntem Frischplasma bei unterschiedlichen Inkubationszeiten

S-2288 (H-D-Ile-Pro-ArgpNA): Trypsin-ähnliche Proteasen

S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA): Plasma-Kallikrein-ähnl. Prot.

E-Werte, S-2288

Zeit	Nativplasma	A2M-Überstand	A2M-Präzipitat
t=1	1.447	0.101	0.087
t=1 +1	0.072	0.081	0.079
t=2	2.092	0.125	0.138
t=2 +1	0.110	0.153	0.180
t=3	0.135	0.105	0.176
t=4	0.026	0.158	0.035

E-Werte, S-2302

Zeit	Nativplasma	A2M-Überstand	A2M-Präzipitat
t=1	0.066	0.134	0.041
t=1 +1	0.062	0.074	0.049
t=2	0.190	0.259	0.115
t=2 +1	0.171	0.171	0.146
t=3	0.063	0.050	0.105
t=4	0.047	0.073	0.029

5. Experimenteller Teil

5.1. Material und Methoden

Kathepsin-G - Substrat:

N-Succinyl-L-Phenylalanyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin-Thiobenzylester / Substrateinwaage: 14 mg Substrat/10 ml DMSO

DMSO = Dimethylsulfoxid

Kathepsin-G - Accelerator: 4,4'-Dithiopyridin (19 mg/50 ml Kathepsin-G - Puffer)

Trypsin-Substrat:

S-2288 (=H-D-Ile-Pro-Arg-pNA) (Kabi Diagnostica)

Substrateinwaage 5 mg/1 ml Aqua dest.

Plasma-Kallikrein - Substrat:

S-2302 (=H-D-Pro-Phe-Arg-pNA) (Kabi Diagnostica)

Substrateinwaage 12 mg/5 ml Aqua dest.

Puffer (Mengenangaben bezogen auf 1 l Endvolumen):

Kathepsin-G - Puffer:

23,8 g HEPES (=N2-Hydroxyäthylpiperazin-N-äthanol-sulfonsäure), 29,2 g NaCl, 0,2 g NaN_3 eingestellt auf End-pH 7,5.

Trypsin - Puffer:

12,1 g TRIS (=Tris(Hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid), 6,2 g NaCl, 0,2 g NaN_3 eingestellt auf End-pH 8,4.

Plasma-Kallikrein - Puffer:

6,1 g TRIS, 0,7 g NaCl, 0,2 g NaN_3 eingest. auf End-pH 7,8.

CNBr-aktivierte Protein A-Sepharose^R CL-4 B (Pharmacia).

Antiserum vom Kaninchen gegen Human- α_2 Makroglobulin

Behring Werke, Marburg).

Untersuchungskollektiv:

Das Untersuchungskollektiv bestand aus 47 Patienten der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten:

1. Gesunde Kontrollprobanden aus der Allergieambulanz der Klinik, bei denen Nüchternplasma gewonnen wurde ($n=18$).
2. Patienten, die sich stationär in der Klinik befanden und bei denen postprandial Blut entnommen wurde (Zustand nach Operationen, Unfällen u. ä., $n=15$).
3. Patienten mit verschiedenen malignen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich vor Beginn der stationär durchgeführten Zytostatika- und Strahlentherapie ($n=14$).

Photometer: Eppendorf.

Zentrifugen: Eppendorf Typ 5412, Hettich Rotixa.

Fraktionssammler (LKB), Eppendorf - Kolbenpipetten.

5.2. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Blut wurde durch Punktion der Cubitalvenen gewonnen. Als Antikoagulans wurde Trinatriumcitratdihydrat (0,1 Volumenanteil auf 0,9 Volumenanteil Blut) verwendet. Unmittelbar nach Gewinnung wurden die zellulären Bestandteile des Blutes abzentrifugiert (15 min. bei 3500 min.^{-1}).

Das plättchenarme Plasma wurde anschließend nach Möglichkeit sofort weiterverarbeitet, andernfalls in Portionen zu 1 ml in Eppendorf - Reaktionsgefäßen unverdünnt eingefroren.

Um die Aktivierung des Hageman-Faktors (F.XIII) nicht zu begünstigen, wurden Plasmasammelgefäße aus Polystyren (Volumen 5 ml) verwendet.

5.3. Reinigung des Antiserums

Aus dem spezifischen Antiserum vom Kaninchen gegen Human- α_2 Makroglobulin wurde das reine, spezifische Immunglobulin G gegen Human-A₂M isoliert.

Dazu wurde immobilisiertes Protein A (Protein A-Sepharose^R CL-4B) verwendet. Das aus der Zellwand von Staphylococcus aureus isolierte Protein A reagiert spezifisch mit dem F_C-Fragment von IgG-Molekülen der Subklassen 1, 2 und 4.

Das Antiserum wurde auf die nach Herstelleranweisung angefertigte Protein A-Sepharose^R CL-4B - Säule aufgetragen. Die nicht gebundenen Bestandteile des Antiserums wurden ausgewaschen und das Protein A-gebundene IgG mit 1 n HAC eluiert. Nach Einstellung auf neutralen pH wurde das IgG-Eluat in der Amicon P₂M-Druckkammer eingeeengt, dialysiert, abschließend nochmals eingeeengt und abzentrifugiert.

5.4. Präzipitation des Plasmas mit gereinigtem Antiserum

Das Plasma wurde für alle folgenden Ansätze mit 0,9%iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Kathepsin G - Ansatz:

0,05 ml Plasma, 0,10 ml Antiserum;

Trypsin- und Plasma-Kallikrein (in Klammern)- Ansätze:

Ansatz	Plasma	Antiserum	NaCl-Lösung (0,9%)	
1	50 (120)	10 (10)	40 (50)	
2	50 (120)	20 (20)	30 (40)	Mikroliter
3	50 (120)	50 (50)	(10)	

Bei diesen Vorversuchen wurde untersucht, welches Verhältnis von Plasma zu Antiserum die größtmögliche Menge an Präzipitationsniederschlag bei Verwendung einer möglichst kleinen Menge an Antiserum erbrachte. Als Resultat ergaben sich folgende Relationen von Plasma zu Antiserum für die Hauptversuchsreihen (Mengenangaben in Mikroliter):

<u>Enzym</u>	<u>Plasma</u>	<u>Antiserum</u>	<u>NaCl-Lösung</u>
Trypsin	50	20	30
Plasma-Kallikrein	120	50	10

Nach gründlichem Mischen wurden die Ansätze für 16 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Proben in den Reaktionsgefäßen 15 min. mit 12000 min.⁻¹ abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und zu den weiteren Versuchen in separate Reaktionsgefäße umgefüllt.

5.5. Messung der Enzymaktivitäten im Plasma

5.5.1. Kathepsin-G-ähnliche Aktivität

<u>Ansatz (Mikroliter)</u>	<u>Probe</u>	<u>Puffer</u>	<u>Substrat</u>	<u>Dithio</u>
Plasma	100	780	50	70
A2M-Überstand	30	850	50	70
Leerwert		880	50	70

Die Proben wurden nach Dithio-Zugabe 60 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert, danach abzentrifugiert und im Photometer (Quarzküvette, d=1 cm) bei 334 nm abgelesen.

Kathepsin-G-ähnliche Aktivität - Meßwerte (Extinktion):

Probe	Leerwert	Nativplasma	A2M-Überstand
N1	0.096	0.195	0.238
N2	0.096	0.246	0.206
T1	0.086	0.210	0.209
T2	0.086	0.190	0.202
T3	0.086	0.175	0.187
T4	0.086	0.178	0.182
T5	0.096	0.150	0.184
T6	0.096	0.168	0.180

N=Kontrolle, T=Tumorplasma

5.5.2. Trypsin- und Plasma-Kallikrein-ähnliche Aktivität

Substrat S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA) für Trypsin

Ansatz	Probe	Puffer	Substrat
Nativplasma	40	860	100
Plasmaeigenfärbung	40	960	
A2M-Überstand	80	920	100
Leerwert		900	100

Substrat S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA) für Plasma-Kallikrein

Ansatz	Probe	Puffer	Substrat
Nativplasma	100	800	100
Plasmaeigenfärbung	100	900	
A2M-Überstand	150	750	100
Leerwert		900	100

Die Proben wurden jeweils nach Substratzugabe 60 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert, danach zentrifugiert und im Eppendorf-Photometer bei 405 nm abgelesen. Zur Einhaltung präziser, genau vergleichbarer Inkubationszeiten wurden die Reaktionen bei den Substraten S-2288 und S-2302 nach abgeschlossener Inkubation mit 100 Mikroliter 50%iger HAC gestoppt.

Die Plasmaeigenfärbung wurde durchgeführt, um eventuelle Verfälschungen durch Blutfarbstoffe ausschließen zu können.

A2M-Überstand ist der Überstand, der nach Zentrifugation des Inkubationsgemisches von Plasma und Antiserum (Inkubationszeit ca. 16 h) aus dem Reaktionsgefäß abgehoben werden konnte. In Vorversuchen wurde sichergestellt, daß sich im Überstand nach Präzipitation von α_2 Makroglobulin kein α_2 -Makroglobulin mehr befand.

Nativplasma steht für das lediglich mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnte, ansonsten unbehandelte, native Plasma.

Die Meßwerte in den Tabellen geben die am Photometer abgelesenen Extinktionswerte an.

Meßwerte - Substrat S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA):

Normalplasma, PEF = Plasmaeigenfärbung

Probe	Leerwert	PEF	Nativplasma	A2M-Überstand
1	0.055	0.003	1.300	0.448
2	0.057	0.005	0.102	0.083
3	0.058	0.010	0.126	0.103
4	0.054	0.002	0.750	0.164
5	0.056	0.006	0.175	0.126
6	0.062	0.009	0.104	0.088
7	0.064	0.003	0.098	0.096
8	0.062	0.021	0.287	0.132
9	0.060	0.007	0.090	0.121
10	0.060	0.005	0.211	0.183
11	0.062	0.012	1.270	0.410
12	0.060	0.014	1.332	0.458
13	0.060	0.004	0.525	0.139
14	0.100	0.005	0.882	0.147
15	0.060	0.006	0.543	0.115
16	0.067	0.007	0.124	0.086
17	0.059	0.003	0.835	0.135
18	0.060	0.002	0.080	0.180

Tumorplasma:

T 1	0.053	0.005	0.649	0.093
T 2	0.059	0.010	0.180	0.094
T 3	0.053	0.005	0.117	0.086
T 4	0.054	0.008	0.110	0.089
T 5	0.054	0.007	0.623	0.130
T 6	0.057	0.008	0.226	0.117
T 7	0.057	0.001	0.212	0.081
T 8	0.055	0.002	0.109	0.072
T 9/1	0.056	0.004	0.092	0.097
T 9/2	0.052	0.004	0.063	0.078
T 9/3	0.055	0.008	0.073	0.083
T10/1	0.053	0.021	0.080	0.090

Meßwerte S-2288 (Fortsetzung):

<u>Probe</u>	<u>Leerwert</u>	<u>PEF</u>	<u>Nativplasma</u>	<u>A2M-Überstand</u>
T10/2	0.050	0.002	0.068	0.080
T10/3	0.061	0.008	0.075	0.087
T11/1	0.054	0.004	0.069	0.081
T11/2	0.054	0.004	0.064	0.080
T12	0.056	0.005	0.067	0.122
T13	0.069	0.004	0.073	0.089
T14	0.063	0.013	0.084	0.095

Meßwerte - Substrat S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA):

Normalplasma (n=nüchtern, p=postprandial)

Probe	Leerwert	PEF	Nativplasma	A2M-Überstand
1 n	0.024	0.012	0.553	0.144
2 n	0.024	0.012	0.059	0.079
3 n	0.007	0.006	0.202	0.089
6 n	0.024	0.020	0.086	0.088
7 n	0.023	0.013	0.083	0.098
8 n	0.015	0.015	0.422	0.089
9 n	0.027	0.015	0.066	0.093
10 n	0.012	0.009	0.306	0.087
11 n	0.012	0.006	0.958	0.335
12 n	0.022	0.014	0.545	0.181
13 n	0.025	0.010	0.412	0.085
14 n	0.027	0.011	0.524	0.080
15 n	0.025	0.010	0.654	0.072
16 n	0.013	0.014	0.097	0.111
17 n	0.015	0.004	0.593	0.056
18 n	0.018	0.001	0.080	0.087
19 p	0.008	0.011	0.067	0.108
20 p	0.011	0.013	0.326	0.133
21 p	0.014	0.033	0.117	0.208
22 p	0.012	0.006	0.123	0.150
23 p	0.012	0.012	0.384	0.139
24 p	0.015	0.006	0.237	0.133
25 p	0.006	0.005	0.094	0.109
26 p	0.007	0.014	0.096	0.178
27 p	0.009	0.005	0.150	0.142
28 p	0.008	0.008	0.207	0.166
29 p	0.008	0.031	0.193	0.221
30 p	0.009	0.009	0.090	0.144
31 p	0.007	0.005	0.080	0.262
32 p	0.008	0.005	0.180	0.168
33 p	0.007	0.016	0.135	0.277

Meßwerte - Substrat S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA):

Tumorplasma

<u>Probe</u>	<u>Leerwert</u>	<u>PEF</u>	<u>Nativplasma</u>	<u>A2M-Überstand</u>
T 1	0.025	0.013	0.519	0.085
T 2	0.031	0.027	0.204	0.093
T 3	0.028	0.008	0.093	0.045
T 4	0.026	0.019	0.126	0.101
T 5	0.030	0.015	0.431	0.108
T 6	0.026	0.017	0.246	0.066
T 7	0.025	0.005	0.220	0.064
T 8	0.029	0.006	0.112	0.048
T 9/1	0.030	0.010	0.255	0.079
T 9/2	0.026	0.013	0.046	0.062
T 9/3	0.027	0.010	0.047	0.077
T10/1	0.027	0.040	0.085	0.100
T10/2	0.028	0.007	0.046	0.055
T10/3	0.027	0.013	0.052	0.067
T11/1	0.027	0.006	0.045	0.057
T11/2	0.027	0.007	0.039	0.052
T12	0.027	0.013	0.050	0.061
T13	0.026	0.009	0.044	0.066
T14	0.026	0.016	0.068	0.059

5.6. Messung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Trypsin- und Plasma-Kallikrein-ähnliche Aktivität

5.6.1. Einfluß verschiedener Antikoagulantien auf die Plasma-Kallikrein-Aktivität (S-2302) im Plasma

Es wurde der Aktivitätsunterschied in Plasma unmittelbar nach Entnahme zwischen Heparin (Heparin-benetztes Blutentnahmeröhrchen, und Trinatriumcitratdihydrat als Gerinnungshemmer gemessen. Plasma-Verdünnung 1:10 (NaCl-Lösung 0,9%), Mischungsverhältnis Citrat:Blut = 1:10.

Meßwerte:

Inkubationszeit 60 min., Dreifachansatz, C=Citrat, H=Heparin

Probe	Leerwert	PEF	Plasma
H1	0.016	0.025	0.191
H2	0.016	0.025	0.155
H3	0.016	0.025	0.177
C1	0.014	0.008	0.105
C2	0.014	0.008	0.117
C3	0.014	0.008	0.118

5.6.2. Einfluß von Einfrieren und Wiederauftauen des Plasmas auf die Proteinase-Aktivität (S-2302)

Es wurden die Proteinaseaktivitäten von Plasma, das sofort nach Entnahme tiefgefroren und nach 1 Tag wieder aufgetaut wurde, mit Hilfe des Substrats S-2302 bestimmt.

Meßwerte (Bedingungen wie 5.6.1.):

Probe	Leerwert	PEF	Plasma
H1	0.017	0.014	0.153
H2	0.017	0.014	0.149
H3	0.017	0.014	0.146
C1	0.016	0.010	0.117
C2	0.016	0.010	0.122
C3	0.016	0.010	0.117

5.6.3. Einfluß der Inkubationszeit bei der Präzipitation von Plasma mit Antiserum gegen Human-A2M

Substrat: S-2302, Proben: gefrorenes Citrat-Plasma (1:10 verdünnt). Präzipitationsansatz (Angaben in Mikroliter):

120 Plasma, 100 Antiserum, 20 NaCl (0,9%).

Präzipitationsinkubationszeiten (in h): 1,2,3,4,6,8,16,24.

Ansatz	Probe	Puffer	Substrat
Nativplasma	100	800	100
A2M-Überstand	200	700	100
A2M-Präzipitat		900	100
Leerwert		900	100

Das Präzipitationssediment wurde nach dreimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung und anschließendem Zentrifugieren mit Substrat versetzt und nach 60 min. Inkubationszeit im Eppendorf-Photometer gemessen. Auch diese Bestimmungen wurden nach der Endpunktmethode durchgeführt, d.h. die Reaktion wurde nach 60 min. Substratinkubationszeit mit 0,1 ml HAc (50%) gestoppt.

Substrat S-2302, t = Inkubationszeit in Stunden

Meßwerte:

Probe	Leerwert	Nativplasma	A2M-Überstand	A2M-Präzipitat
t1	0.016	0.092	0.170	0.069
t2	0.022	0.146	0.201	0.073
t3	0.019	0.115	0.098	0.063
t4	0.022	0.089	0.080	0.058
t4'	0.012	0.207	0.115	0.059
t6	0.015	0.092	0.088	0.035
t8	0.015	0.098	0.093	0.057
t16	0.016	0.080	0.094	0.048
t24	0.016	0.076	0.088	0.047

5.6.4. Aktivitätsbestimmung von unverdünntem, frisch entnommenem Plasma bei verschiedenen Präzipitationszeiten mit Antiserum gegen Human-A2M

Plasma (0,02 ml) wurde unverdünnt mit Antiserum (0,10 ml) gegen Human-A2M verschieden lange inkubiert ($t=1, 2, 3$ u. 4 h). Danach wurden die Proben zentrifugiert (12000 min.^{-1}) und der Überstand in separate Reaktionsgefäße umgefüllt. Die Präzipitationssedimente wurden dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zentrifugiert (12000 min.^{-1}). Die getrockneten Sedimente wurden dann mit Substrat versetzt, 60 min. lang inkubiert und im Eppendorf-Photometer gemessen.

Substrat S-2288

<u>Ansatz</u>	<u>Probe</u>	<u>Puffer</u>	<u>Substrat</u>
Nativplasma	10	890	100
A2M-Präzipitat		900	100
A2M-Überstand	60	840	100
Leerwert		900	100

Substrat S-2302

<u>Ansatz</u>	<u>Probe</u>	<u>Puffer</u>	<u>Substrat</u>
Nativplasma	10	890	100
A2M-Präzipitat		900	100
A2M-Überstand	60	840	100
Leerwert		900	100

Die proteolytische Aktivität wurde jeweils nach 1 und nach 2 Stunden nach Substratzugabe (Inkubation im Wasserbad, 37°C) bestimmt.

Präzipitationsansätze:

$t = x + 1h$: Messung nach x h mit Nachmessung nach nochmaliger Inkubation für 1 h.

Substrat S-2288: H-D-Ile-Pro-Arg-pNA;

Substrat S-2302: H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.

t = Präzipitationszeit in Stunden.

Meßwerte: Substrat S-2288

Probe	LW	N.Pl.	A2M-Überst.	A2M-Präzipitat
$t=1$ h	0.029	1.476	0.130	0.116
$t=1 +1$	0.096	0.168	0.177	0.175
$t=2$	0.178	2.270	0.303	0.316
$t=2 +1$	0.142	0.252	0.295	0.322
$t=3$	0.028	0.163	0.133	0.204
$t=4$	0.048	0.074	0.206	0.083

Substrat S-2302:

Probe	LW	N.Pl.	A2M-Überst.	A2M-Präzipitat
$t=1$	0.022	0.088	0.156	0.063
$t=1 +1$	0.068	0.130	0.142	0.117
$t=2$	0.085	0.275	0.344	0.200
$t=2 +1$	0.024	0.195	0.195	0.170
$t=3$	0.019	0.082	0.069	0.124
$t=4$	0.020	0.067	0.093	0.049

LW = Leerwert, N.Pl. = Nativplasma, A2M-Überst. = Überstand nach Präzipitation von A2M, A2M-Präzipitat = Niederschlag nach Fällung von Human-A2M mit spezifischem Antiserum.

6. Diskussion

Enzymaktivitäten, die sich mit chromogenen Peptidsubstraten im Plasma messen lassen, sind nur eingeschränkt interpretierbar, da auch an α_2 -Makroglobulin gebundene Proteasen diese Substrate spalten können. Trotz der kurzen Halbwertszeit dieser Komplexe ist nicht zu erkennen, ob es sich bei den gemessenen Enzymaktivitäten um "freie" und somit proteolytisch aktive Proteasen handelt, oder ob es im Komplex gefangene ("entrapped") Enzyme sind, die lediglich proteolytische Aktivität vortäuschen.

Von außerordentlichem medizinischem Interesse sind in diesem Zusammenhang proteolytische Enzymaktivitäten, die durch das körpereigene Inhibitorpotential nicht mehr kompensiert werden können. Diese überschießende Proteolyse kann zu schwersten Schädigungen des Organismus führen, als Beispiel sei hier nur die akute Pankreatitis angeführt.

Diese Problematik legt nun die Überlegung nahe, wie die in vitro bereits hinreichend nachgewiesenen A2M-Proteinase-Komplexe auch in vivo rationell, und somit für das Routinelabor geeignet, gemessen und vor allem von der "freien" Aktivität unterschieden werden können.

Aus ersten Untersuchungen der A2M-Enzym-Komplexe durch HOCHSTRASSER ergab sich, daß die im Plasma mit chromogenen Substraten meßbaren Enzymaktivitäten in der Regel zu niedrig waren, um eine zuverlässige Auswertung zu ermöglichen. Als Ursache dafür wurde die zu niedrige Konzentration von A2M-Komplexen im Plasma angenommen, da diese sehr schnell vor allem von den Zellen des retikuloendothelialen Systems und

von Makrophagen eliminiert werden. Die Konzentration von A2M im Plasma ist normalerweise sehr hoch, doch nur A2M-Komplexe, die mit aktivierten Proteasen beladen sind, können mit chromogenen Substraten gemessen werden.

Weitere Versuche HOCHSTRASSERS dienten der Klärung der Frage, ob eine Anreicherung der A2M-Enzym-Komplexe über die Bindung von A2M an spezifische Antikörper möglich ist. Es zeigte sich dabei, daß auch in den so entstandenen Immunkomplexen enzymatische Aktivität meßbar ist, d.h. daß diese Methode prinzipiell zur Anreicherung geeignet ist.

Die Bindung von A2M-Komplexen an spezifische Antikörper und die Testung mit chromogenen Peptidsubstraten entspricht in der Durchführung einem modifizierten ELISA (=enzyme linked immunosorbent assay), wobei aber im Gegensatz zum ELISA das als Antigen in Form des A2M-Komplexes vorliegende Enzym, in diesem Fall eine Proteinase, zur Erkennungsreaktion dient. Von HOCHSTRASSER anfangs verwendete Mikrotiter-Platten, die mit spezifischen Antikörpern gegen A2M beladen waren, zeigten aber, daß auch hier noch nicht genügend Immunkomplexe gebunden werden konnten, folglich auch die meßbaren Aktivitätswerte noch zu niedrig waren.

In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob die Behandlung von Humanplasma unterschiedlicher Probandengruppen mit spezifischem, gereinigtem Antiserum gegen Human-A2M geeignet ist, A2M-Enzym-Komplexe so stark anzureichern, daß mit chromogenen Peptidsubstraten ausreichende Aktivitätswerte gemessen werden können. Verwendet wurden dazu das chromogene

Substrat S-2302, das hochspezifisch für Plasma-Kallikrein-ähnliche Aktivität im Plasma ist und S-2288, das nach Herstellerbeschreibung (wie S-2302 KABI Diagnostica) besonders geeignet ist zur Messung von Trypsin-ähnlicher Aktivität.

Diese Methode war grundsätzlich gesehen erfolgreich, doch zeigte sich während der Versuche, daß nicht bei jeder Probe mit den verwendeten Substraten proteolytische Aktivitäten meßbar waren und daß bei einigen Proben nach erfolgter Präzipitation im Überstand höhere Enzymaktivitäten gemessen wurden als im Nativplasma, das eigentlich immer die höchsten Werte aufweisen sollte.

Diese Diskrepanzen fanden sich vor allem beim Tumorkollektiv sowie bei der Gruppe, bei der postprandial Plasma entnommen wurde.

Es zeigte sich schließlich, daß die Untersuchung der A2M-Komplexe möglichst mit nicht verdünntem Frischplasma erfolgen sollte. Die Verwendung von zuletzt 0,1 ml Antiserum pro Präzipitationsansatz brachte den großen Nachteil eines für die routinemäßige Durchführung zu hohen finanziellen Aufwandes mit sich, auch ist das hier angewandte Verfahren für sehr große Serien noch zu problematisch.

Bei Weiterführung dieser Versuche gelang es HOCHSTRASSER und Mitarb. nun die Oberfläche von Kunststoffröhrchen (Behring) mit ausreichenden Mengen spezifischer Antikörper gegen Human - A2M zu beschichten, so daß in jedem Fall bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Substrate auf sehr einfache und vor allem kostensparende Weise aussagekräftige Meßwerte erzielt werden können.

7. Zusammenfassung

Alpha₂-Makroglobulin nimmt aufgrund seiner herausragenden Merkmale eine besondere Rolle unter den Plasmaproteinasen-inhibitoren ein. So ist das Fehlen von A2M mit dem Leben nicht vereinbar. Ferner interferiert A2M mit dem Nachweis proteolytischer Aktivität im Blut, da niedermolekulare Peptidsubstrate von Plasmaproteinasen trotz deren Inhibition durch A2M gespalten werden können und somit falsch-positive Aktivität anzeigen.

Ziel dieser Arbeit war die Ausarbeitung eines Verfahrens, durch welches zwischen freier, aktiver Proteinaseaktivität und im A2M-Proteinase-Komplex gebundener und somit gehemmter Aktivität unterschieden werden kann.

Es zeigte sich nun bei der Versuchsdurchführung, daß es möglich ist, A2M-Komplexe ebenso wie freies A2M immunologisch mit Hilfe spezifischen Kaninchen-Antiserums gegen Human-A2M auszufällen ohne die gebundene Proteinase zu verändern. Die enzymatische Aktivität wurde mittels niedermolekularer, chromogener Peptidsubstrate in einem modifizierten ELISA-Verfahren gemessen, wobei im Gegensatz zum ELISA die als Antigen im A2M-Komplex gebundene Proteinase zur Erkennungsreaktion dient. Bei Weiterführung dieser Versuche durch HOCHSTRASSER und Mitarb. gelang es, Kunststoffröhrchen mit spezifischem Antikörper gegen Human-A2M zu beschichten und es so zu ermöglichen, dieses Verfahren auch im Routinelabor einzusetzen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. AASEN, A.O., GALLIMORE, M.J., OHLSSON, K., AMUNDSEN, E.:
Haemostasis 7, S.164-169 (1978)
2. AEILGAARD, U.: in:
Referenz 19, S.239-241
3. ABAL, H., MIYAKAWA, T., OZAKI, K., SAKURAGAWA, N.:
Thrombosis Research 31, S.197-202 (1983)
4. BALDIN, G., OHLSSON, K.:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, S.357-361 (1981)
5. BANG, N.U., MATTLER, L.E.:
Haemostasis 7, S.98-104 (1978)
6. BARRETT, A.J.:
Methods in Enzymology 80, S.737-754 (1981)
7. BARRETT, A.J.: in:
Referenz 104, S. 59-67
8. BARRETT, A.J., SALVESEN, G.S.: in:
Referenz 19, S. 247-254
9. BAUGH, R.J., SCHNEBLI, H.P.: in:
Referenz 104, S. 157-180
10. BERGQVIST, D., NILSSON, I.M.:
Scand. J. Haematol. 23, S.433-436 (1979)
11. BIETH, J., KLUMPP, T.:
Biochim. Biophys. Acta 439, S.363-367 (1976)
12. BRACKERTZ, D.:
Deutsche Med. Wochenschrift 103, S.1844-1849 (1978)
13. BRANECAR, E., OSTERBROG, P., SJÖBERG, B.:
Eur. J. Biochem. 122, S. 663-666 (1982)

14. BURNETT,D., STOCKLEY,R.A.:
Thorax 36, S.512-516 (1981)
15. CEDERHOLM-WILLIAMS,S.A.:
J. Clin. Pathol. 34, S.979-981 (1981)
16. CHESNE,S., VILLIERS,C.L., ARLAUD,G.J., LACROIX,M.B.,
COLOMB,M.G.:
Biochem. J. 201, S.61-70 (1982)
17. CLAESON,G., AURELL,F., FRIBERGER,P., GUSTAVSSON,S.,
KARLSSON,G.:
Haemostasis 7, S.62-68 (1978)
18. CLEMMENSEN,I., THORSEN,S., MÜLLERTZ,S., PETERSEN,L.C.:
Eur. J. Biochem. 120, S.105-112 (1981)
19. COLLEN,D.:
Thrombosis & Haemostasis 43, S.77-89 (1980)
20. COLLEN,D., WIMAN,B., VERSTRAETE,M. (Eds.):
"The Physiological Inhibitors of Blood Coagulation and
Fibrinolysis" - Amsterdam (1979)
21. CULLMANN,W., DICK,W.:
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 19, S.287-290 (1981)
22. CULLMANN,W., DICK,W., MÜLLER,N.:
Innere Medizin 8, S.235-238 (1981)
23. CULLMANN,W., KÖVARY,P.M., DICK,W., CZARNETZKI, B.,
ECHTERNACH-HAPPLE,K.:
Clinica Chimica Acta 119, S.237-242 (1982)
24. DE BOER,A.C., VAN RIEL,L.A.M., DEN OTTOLANDER,G.J.H.:
Thrombosis Research 15, S.17-25 (1979)
25. DELSHAMMAR,M., OHLSSON,K.:
Surgery 83, S.323-327 (1978)
26. EGBERG,N., BERGSTRÖM,K.:
Haemostasis 7, S.85-91 (1978)

27. FÄSSLER, H., DUCKERT, F., MARBET, G.A.:
Haemostasis 7, S.158-163 (1978)
28. FEINSTEIN, G.: in:
Referenz 38, S.179-190
29. FRIBERGER, P.:
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 42 (Suppl. 162) - 1982
30. FRYKSMARK, U., OHLSSON, K., ROSENGREN, M., TEGNER, H.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, S.793-800 (1983)
31. GALDSTON, M.: in:
Referenz 38, S.191-194
32. GALLIMORE, M.J., AMUNDSEN, E., LARSBRAATEN, M., LYNGAAS, K., FAREID, E.:
Thrombosis Research 16, S.695-703 (1979)
33. GALLIMORE, M.J., FRIBERGER, P.:
Thrombosis Research 25, S.293-298 (1982)
34. GRAMSE, M., EGBRING, R., HAVEMANN, K.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 365, S.19-26 (1984)
35. GYZANDER, E., TEGER-NILSSON, A.C.:
Thrombosis Research 19, S.165-175 (1980)
36. HARPEL, P.C.:
Methods in Enzymology XLV, S.639-645 (1976)
37. HARPEL, P.C., HAYES, M.B.: in:
Referenz 19, S.231-238
38. HAVEMANN, K., JANOFF, A. (Eds.):
"Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leuko-
cytes" - Baltimore-Munich (1978)
39. HAYES, M.B., HARPEL, P.C.: in:
Referenz 19, S.273-280

40. HIRANO,K., OKUMURA,Y., HAYAKAWA,S., ADACHI,T.,
SUGIURA,M.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 365, S.27-32 (1984)
41. HOCHSTRASSER,K., BRETZEL,G., FEUTH,H., HILLA,W., LEM-
PART,K.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 357, S.153-162 (1976)
42. HOWARD,J.B., VERMEULEN,M., SWENSON,R.P.:
J. Biol. Chem. 255, S.3820-3823 (1980)
43. HUBBARD,W.J., HESS,A.D., HSIA,S., AMOS,D.B.:
J. Immunol. 126, S.292-299 (1981)
44. JESPERSEN,J., SIDELMANN,J.:
Thrombosis & Haemostasis 50, S.581-585 (1983)
45. JOCHUM,M., BITTNER,A.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, S.1709-1715 (1983)
46. JOHNSON,D., TRAVIS,J.:
J. Biol. Chem. 254, S.4022-4026 (1979)
47. KARLSON,P.:
"Kurzes Lehrbuch der Biochemie", 11.Auflage 1980,
Stuttgart-New York
48. KHAN,S.A., ERICKSON,B.W.:
J. Biol. Chem. 257, S.11864-11867 (1982)
49. KOIDE,T., TAKAHASHI,K., ODANI,S., ONO,T.:
Thrombosis Research 31, S.319-328 (1983)
50. LÄMMLER,B., EICHLISBERGER,R., MARBET,G.A., DUCKERT,F.:
Thrombosis Research 16, S.245-254 (1979)
51. LAMBIN,P., POCHON,F., FINE,J.M., STEINBUCH,M.:
Thrombosis Research 32, S.123-132 (1983)

52. LASKOWSKI, M. (Jr.), KATO, I.:
Ann. Rev. Biochem. 49, S.593-626 (1980)
53. LASSON, A., DITTMANN, B., OHLSSON, K.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, S.1315-1322 (1983)
54. LATALLO, Z.S., TEISSEYRE, E., LOPACIUK, S.:
Haemostasis 7, S.150-154 (1978)
55. LEBRETON DE VONNE, T., MOURAY, H.:
Clin. Chim. Acta 90, S.83-85 (1978)
56. LÖFFLER, G., PETRIDES, P.E., WEISS, L., HARPER, H.A.:
"Physiologische Chemie" - 2.Auflage 1979, Berlin -
Heidelberg - New York
57. LOSITO, R., GATTIKER, H., BILODEAU, G., VERVILLE, N., LONG-
PRÉ, B.:
J. Lab. Clin. Med. 97, S.241-250 (1981)
58. MACARTNEY, H.W., TSCHESCHE, H.:
Eur. J. Biochem. 130, S.85-92 (1983)
59. MACARTNEY, H.W., TSCHESCHE, H.:
Eur. J. Biochem. 130, S.93-97 (1983)
60. MAHOUR, G.H., SONG, M.K., ADHAM, N.F., RINDERKNECHT, H.:
Pediatrics 61, S.894-897 (1978)
61. MARKS, W.H., EDDELAND, A., OHLSSON, K.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 362, S.1653-1656 (1981)
62. MATHESON, N.R., WONG, P.S., TRAVIS, J.:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, S.402-409 (1979)

63. MILES,L.A., BURNIER,J.P., VERLANDER,M.S., GOODMAN,M.,
KLEISS,A.J., GRIFFIN,J.H.:
Blood 57, S.1015-1024 (1981)
64. MINAKATA,K., ASANO,M., SATO,T., HARADA,N.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 363, S.493-498 (1982)
65. MISKULIN,M., MOATI,F., ROBERT,M., ROBERT,L., MONTEIL,
R., GUILBAUD,J.:
J. Clin. Pathol. 31, S.866-871 (1978)
66. MISZCZUK-JAMSKA,B., GUY,O., FIGARELLA,C.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, S.509-513 (1983)
67. MISZCZUK-JAMSKA,B., GUY,O., FIGARELLA,C.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, S.1597-1601 (1983)
68. MORSE,J.O.:
N. Engl. J. Med. 299, S.1045-1048 (I), 1099-1105 (II)
(1978)
69. MÜLLERTZ,S.: in:
Referenz 19, S.243-245
70. NELLES,L.P., SCHNEBLI,H.P.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 363, S.677-682 (1982)
71. NILSSON,T., SJÖHOLM,I., WIMAN,B.:
Biochim. Biophys. Acta 705, S.264-270 (1982)
72. NILSSON,T., WIMAN,B.:
Eur. J. Biochem. 129, S.663-667 (1983)
73. NILSSON,T., WIMAN,B.:
Biochim. Biophys. Acta 705, S.271-276 (1982)
74. ODUM,L., INGWERSEN,S.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, S.1671-1677 (1983)

75. OHLSSON,K.: in:
Referenz 38, S.167-177
76. OHLSSON,K., LAURELL,C.B.:
Clin. Sci. Mol. Med. 51, S.87-92 (1976)
77. OHLSSON,K., POLLING,A., STENBERG,P.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 363, S.213-220 (1982)
78. OHLSSON,K., SKUDE,G.:
Clin. Chim. Acta 66, S.1-7 (1976)
79. OHLSSON,M., ROSENGREN,M., TEGNER,H., OHLSSON,K.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, S.1323-1328 (1983)
80. PICKERING,N.J., BRODY,J.I., FINK,G.B., FINNEGAN,J.O.,
ABLAZA,S.:
Amer. J. Clin. Pathol. 80, S.459-464 (1983)
81. POCHON,F., BIETH,J.G.:
J. Biol. Chem. 257, S.6683-6685 (1982)
82. QUIGLEY,J.P., ARMSTRONG,P.B.:
J. Biol. Chem. 258, S.7903-7906 (1983)
83. REEVE,E.B.:
Thrombosis Research 18, S.19-31 (1980)
84. SAKURAGAWA,N., TAKAHASHI,K., KONDO,S., KOIDE,T.:
Thrombosis Research 31, S.305-317 (1983)
85. SALOMON,D.S., BANO,M., SMITH,K.B., KIDWELL,W.R.:
J. Biol. Chem. 257, S.14093-14101 (1982)
86. SALVESEN,G.S., SAYERS,C.A., BARRETT,A.J.:
Biochem. J. 195, S.453-461 (1981)

87. SCHAPIRA, M., SCOTT, C.F., COLMAN, R.W.:
J. Clin. Invest. 69, S.462-468 (1982)
88. SCHAPIRA, M., SILVER, L.D., SCOTT, C.F., COLMAN, R.W.:
Blood 59, S.719-724 (1982)
89. SCHRAMM, H.J., SCHRAMM, W.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 363, S.803-812 (1982)
90. SESBOÛÉ, R., BASUYAU, J.P., SALIER, J.P.:
Clin. Chim. Acta 135, S.23-33 (1983)
91. SHAPIRA, E., BEN-YOSEPH, Y., NADLER, H.L.:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, S.864-870 (1976)
92. SIM, R.B., REBOUL, A.:
Methods in Enzymology 80, S.43-54 (1981)
93. SOTTRUP-JENSEN, L., PETERSEN, T.E., MAGNUSSON, S.:
FEBS Letters 128, S.123-126 (1981)
94. SOTTRUP-JENSEN, L., PETERSEN, T.E., MAGNUSSON, S.:
FEBS Letters 128, S.127-132 (1981)
95. SOTTRUP-JENSEN, L., STEPANIK, T.M., JONES, C.M., PETER-
SEN, T.E., MAGNUSSON, S.: in:
Referenz 105, S. 255-271
96. SPENCER, K., COOMBES, E.J., WOOD, P.J.:
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, S.133-137 (1983)
97. STARKEY, P.M.: in:
Referenz 19, S.221-230
98. STARKEY, P.M., BARRETT, A.J.:
Biochem. J. 205, S.91-95 (1982)
99. STARKEY, P.M., FLETCHER, T.C., BARRETT, A.J.:
Biochem. J. 205, S.97-104 (1982)

100. STARKEY, P.M., BARRETT, A.J.:
Biochem. J. 205, S.105-115 (1982)
101. STEINBUCH, M., LAMBIN, P., GRANIER, C., KICHENIN, V.,
GARNIER, A.: in:
Referenz 19, S.281-290
102. STENBJERG, S.:
Thrombosis Research 22, S.491-495 (1981)
103. STORMORKEN, H., BAKLUND, A., GALLIMORE, M., RITLAND, S.:
Haemostasis 7, S.69-75 (1978)
104. STORMORKEN, H., GOGSTAD, G.O., BROSSTAD, F.:
Thrombosis Research 31, S.647-651 (1983)
105. STRÄULI, P., BARRETT, A.J., BAICI, A. (Eds.):
"Proteinases and Tumor Invasion" - Raven Press -
New York 1980
106. STRAIGHT, D.L., McKEE, P.A.:
Biochemistry 21, S.4550-4556 (1982)
107. TAKADA, A., TAKADA, Y.:
Thrombosis Research 18, S.205-211 (1980)
108. TAKADA, A., TAKADA, Y.:
Thrombosis Research 18, S.237-246 (1980)
109. TEGER-NILSSON, A.C., GYZANDER, E., MYRWOLD, H., NOPPA, H.,
OLSSON, R., WALLMO, L.:
Haemostasis 7, S.155-157 (1978)
110. TRAVIS, J., BOWEN, J., BAUGH, R.:
Biochemistry 17, S.5651-5656 (1978)
111. TRAVIS, J., GARNER, D., BOWEN, J.:
Biochemistry 17, S.5647-5651 (1978)

112. TRAVIS, J., JOHNSON, D.:
Methods in Enzymology 80, S.754-765 (1981)
113. TRAVIS, J., MORII, M.:
Methods in Enzymology 80, S.765-771 (1981)
114. TSCHESCHE, H.: in:
GRÖZINGER, K.H., SCHREY, A., WAENITZ, R.W. (Eds.):
"Proteinase-Inhibition - FCY-Workshop Düsseldorf 1981"
München 1982, S.13-43
115. TSCHESCHE, H., JEPPSSON, J.-O.:
11th FEBS Meeting, Copenhagen (1977), S.217-224
116. VAN LEUVEN, F.:
Trends in Biochemical Science 5, S.185-187 (1982)
117. VAN LEUVEN, F., CASSIMAN, J.-J., VAN DEN BERGHE, H.:
J. Biol. Chem. 256, S.9016-9022 (1981)
118. VAN LEUVEN, F., CASSIMAN, J.-J., VAN DEN BERGHE, H.:
J. Biol. Chem. 256, S.9023-9027 (1981)
119. VAN LEUVEN, F., CASSIMAN, J.J., VAN DEN BERGHE, H.:
Biochem. J. 201, S.119-128 (1982)
120. VELASCO, F., TORRES, A., ANDRES, P., DURAN, M.I.:
Thrombosis & Haemostasis 47, S.275-277 (1982)
121. VIRCA, G.D., SALVESEN, G.S., TRAVIS, J.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, S.1297-1302 (1983)
122. WEISS, V., ENGEL, J.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, S.295-301 (1983)
123. WESTRÖM, B.R.:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 360, S.1861-1867 (1979)

124. WESTRÖM, B.R., KARLSSON, B.W., OHLSSON, K.:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, S. 375-381 (1983)
125. WIMAN, B.:
Methods in Enzymology 80, S. 395-408 (1981)
126. WIMAN, B., NILSSON, T.:
Clin. Chim. Acta 128, S. 359-366 (1983)
127. WINKELMAN, L.:
Thrombosis Research 29, S. 383-386 (1983)
128. WITT, I., TRITSCHLER, W.:
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, S. 429-436 (1983)
129. WOOLLEY, D.E., ROBERTS, D.R., EVANSON, J.M.:
Nature (London) 261, S. 325-327 (1976)
130. WOOLLEY, D.E., TETLOW, L.C., MOONEY, C.J., EVANSON, J.M.:
in:
Referenz 105, S. 97-115

Herrn Prof. Dr. Kar. v. Schottmann die ich für die freundliche
Überlassung des Manusk. der Beschreibung und der Artbeschreibung
in diesem Buch und die Unterstützung bei der Durchführung der-
selben anerkenne. Herrn Prof. Dr. H. Schottmann für die Übernahme der
Korrektur zu großem Dank verpflichtet.
Ferner möchte ich den Namen des kaiserlichen Hofrathes, Herrn
des Prof. Dr. v. Schottmann dankend für ihre Kräfte und
gütigen Ratschläge danken.

Lebenslauf

Name: Hans Rainer Josef S l a w i k

Geburtstag und - ort: 19.März 1958 in Buchen/Odenwald

Eltern: Dr.med. Friedrich Slawik und Ehe-
frau Maria, geb. Pleschko

Schulbildung: 1964 - 1968 = 4 Jahre Grundschule
in Augsburg
1968 - 1977 = 9 Jahre am Human.
Gymnasium bei St.Stephan in Augsburg
mit Erteilung der Hochschul-
reife 1977

Wehrdienst: 01.04.1978 bis 30.04.1979 als
Sanitätssoldat in München

Studium: Sommersemester 1979 bis Sommer-
semester 1985 Studium der Human-
medizin an d. Ludwig-Maximilians-
Universität in München

Ärztliche Prüfung: Bestanden am 5.November 1985

Approbation: Erteilt am 13.November 1985

Ärztliche Tätigkeit: 01.12.85 bis 11.03.86 Assistent
in einer internistischen Praxis
in Augsburg;
seit 12.03.86 Assistenzarzt in
der II.Medizinischen Klinik des
Krankenhauszweckverbandes
Augsburg im Zentralklinikum

